

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SERGE WINOGRADSKY

(1856-1953)

Le 24 février 1953, Serge Nicolaevitch Winogradsky s'est éteint dans cet Institut Pasteur de Brie-Comte-Robert, qu'il animait depuis 1922. Avec lui disparaît un très grand savant, pionnier de la microbiologie et l'un des deux derniers fondateurs de l'école pasteurienne qui aient été en contact direct avec Pasteur.

Serge Winogradsky était né le 1^{er} septembre 1856 à Kiev. Son père, haut fonctionnaire, devait y achever sa carrière comme directeur d'une des banques de la ville. En 1873, après des études secondaires brillantes au Gymnase, Serge Winogradsky s'inscrit à la Faculté de Droit de l'Université de Kiev, suivant en cela les traces de son père et de son frère aîné, Alexandre. Mais l'exemple de ce dernier, qui allait devenir un brillant chef d'orchestre, et le peu de goût qu'il éprouve lui-même pour les études de droit, alors qu'il se sent attiré par la musique, le conduisent à abandonner la Faculté de Droit puis, après deux ans passés à la Faculté des Sciences, à entrer au Conservatoire Impérial de Saint-Petersbourg, dans la classe prestigieuse de Lechetitsky, qui fut plus tard le maître de Paderewsky. Mais un incident qui atteint la carrière de son maître dont il prend vivement le parti, le détermine en 1877 à retourner à la Faculté des Sciences, sans pour cela renoncer à la musique qu'il n'abandonnera jamais.

Sa formation scientifique terminée avec le botaniste russe

Famintzin, Winogradsky entre, en 1885, à Strasbourg, dans le laboratoire du professeur De Bary, mycologue réputé. Il s'y attache spécialement à l'étude des bactéries autotrophes, en particulier celles des eaux sulfureuses. Ces germes attirent l'attention par des granules de soufre colloïdal dont leurs cellules sont souvent bondées. Winogradsky arrive à déceler le rôle de ces inclusions dont aucune explication valable n'avait pu être donnée. Il montre que le soufre provient de l'oxydation de l'hydrogène sulfuré qui tient lieu de source d'énergie, son oxydation étant poussée par la bactérie jusqu'à l'acide sulfurique : la transformation chimique obtenue aux dépens d'un simple élément inorganique est donc l'équivalent énergétique de l'acte respiratoire.

En 1887, la mort de Bary met fin à la période strasbourgeoise de la vie de Winogradsky, et c'est à l'Université de Zurich qu'il va travailler de 1888 à 1891. Il y continue ses travaux sur les bactéries autotrophes et les bactéries des eaux ferrugineuses, puis il aborde le problème de la nitrification. Il y apporte une solution définitive en démontrant que tout le groupe des bactéries nitrifiantes possède le caractère aussi remarquable qu'inattendu d'assimiler l'acide carbonique par chimiosynthèse, mécanisme physiologique homogène de l'assimilation chlorophyllienne par photosynthèse. Ses travaux lui valent une réputation mondiale et le prix décennal Leeuwenhoek décerné par l'Académie Hollandaise, avec un jugement que le temps a ratifié : « La science doit à Winogradsky la vision nette de l'existence d'une catégorie d'organismes microscopiques dont les fonctions vitales sont tellement surprenantes qu'il n'est que juste de dire que Winogradsky a ajouté un chapitre nouveau à la physiologie générale. »

En 1890, Winogradsky a déjà publié dans les *Annales* de l'Institut Pasteur tout une série de mémoires sur les bactéries sulfureuses, la nitrification et le pléomorphisme bactérien, qui ont définitivement établi sa renommée scientifique. Pendant l'été, il reçoit à Zurich la visite de Metchnikoff qui vient, au nom de Pasteur, lui proposer d'entrer à l'Institut Pasteur comme chef de service. Winogradsky hésite, vient en 1891 à Paris où il voit longuement Pasteur, tout près d'accepter son offre. Mais à ce moment se crée à Saint-Petersbourg l'Institut de Médecine expérimentale, sur le modèle de l'Institut Pasteur, où sa place est déjà marquée.

Winogradsky, désireux de retourner en Russie et sentimentalement attaché au domaine familial qui vient de lui échoir, décline finalement l'offre de Pasteur. Mais il gardera par la suite avec l'Institut Pasteur un contact permanent.

Winogradsky reçoit en 1891 la place de chef de la section de Microbiologie générale à l'Institut Impérial de Médecine expérimentale. En 1903, il est nommé Directeur de cet Institut, Président de la Société de Microbiologie, Membre du Conseil Médical de l'Empire. Ses travaux, sa réputation mondiale ont fait de lui

un des savants les plus en vue. Les honneurs académiques affluent de tous côtés. C'est l'époque où il étudie la fixation de l'azote atmosphérique et son agent anaérobie, *Clostridium pastorianum*.

En 1905, à la surprise de tous, Serge Winogradsky interrompt sa carrière scientifique. Sa santé l'avait déjà obligé à un repos sur la côte d'Azur, mais il avait repris ses fonctions. Il les abandonne définitivement au moment de la guerre du Japon, les circonstances ayant bouleversé les projets qu'il avait formés pour le développement de son Institut et l'atmosphère de l'époque lui paraissant contraire à la poursuite du travail scientifique. Il se retire en Podolie, dans la propriété familiale où s'est déroulée son enfance. Il se consacre à l'exploitation de ses terres et au culte de la musique. Et lorsque survient la révolution, il n'est plus, en 1920, qu'un propriétaire terrien chassé par la guerre civile. Il cherche d'abord refuge en Suisse, puis accepte une place de professeur à la Faculté des Sciences agronomiques de Belgrade où il se remet dans le courant scientifique et, courageusement s'efforce de recréer un laboratoire, malgré les difficultés qui résultent de la guerre toute récente.

En février 1922, il reçoit une lettre du Dr Roux qui lui dit : « Mes collègues et moi vous serions reconnaissants de venir vous établir à l'Institut Pasteur ; vous y apporterez votre illustration scientifique et vous pourrez y poursuivre sans aucune préoccupation d'enseignement vos belles recherches. Nous serions fiers de compter, avec Metchnikoff, Winogradsky parmi les nôtres. Vous serez pour nous le Maître en ce qui concerne la bactériologie du sol. »

Winogradsky n'hésite pas, tant cette offre répond à son vœu intime : « Il y a 33 ans, écrit-il alors à Omeliansky, Pasteur m'a invité à venir à Paris ; j'ai opté pour Saint-Pétersbourg, mais les portes de l'Institut Pasteur me sont restées grandes ouvertes. Après la disparition du Maître, je réponds à l'invitation de son plus proche collaborateur et élève : peut-être aurais-je encore la force de faire un travail utile. »

Roux aménage une propriété en Seine-et-Marne qui devient la filiale de Brie-Comte-Robert, consacrée à l'étude de la microbiologie du sol : c'est là que Winogradsky travaillera jusqu'à son dernier souffle.

C'est là qu'il écrit, à partir de 1925, la série des 10 mémoires célèbres sur la microbiologie du sol que publient ces *Annales*, et où il renouvelle entièrement le sujet en apportant une méthode originale, celle des gels de silice, appliquée à l'étude de la microflore du sol. Il met en relief l'intérêt de l'étude écologique des microbes du sol dans leur milieu naturel complexe, poursuit des recherches sur les fixateurs de l'azote atmosphérique, symbiotiques et non symbiotiques, sur le pouvoir fixateur des terres, la dégra-

dation de la cellulose, la synthèse de l'ammoniaque par les *Azotobacter*, en un mot trace la voie de toute une science nouvelle, celle de la microbiologie du sol.

Malgré les années, malgré les événements, Winogradsky, secondé d'abord par Lars-Gunnar Romell et M^{me} Edwige Ziemiecka, puis à partir de 1931 par sa fille cadette, continue à travailler sans relâche, enfermé dans son laboratoire comme dans un ermitage, de plus en plus isolé du monde, de plus en plus concentré sur son œuvre. En mars 1952, une attaque de grippe fut suivie de troubles circulatoires périphériques inquiétants qui, s'ils ne parvinrent pas à interrompre son ardeur au travail, devaient finalement avoir raison de sa vie.

L'œuvre immense de Winogradsky est celle d'un pionnier et d'un fondateur. Le temps y apportera sans doute des retouches mais ne l'ébranlera pas et le magnifique essor des travaux qui prolongent l'œuvre de Winogradsky ne font qu'en souligner l'originalité. La microbiologie du sol n'a pas seulement élucidé l'un des problèmes les plus passionnants et les plus importants de la vie à la surface de la terre, permis le progrès et l'amélioration des rendements dans l'agriculture, elle a encore conduit, par un détour imprévu, à l'étude des antibiotiques. En contribuant, en novembre 1949, avec l'appui de la Fondation Rockefeller, à la publication des œuvres de Winogradsky, Selman A. Waksman rendait un hommage mérité à l'œuvre scientifique et à la puissante personnalité de son auteur. Cette œuvre s'inscrit dans la plus pure tradition pasteurienne : Omeliansky remarque que Winogradsky s'est toujours proclamé le disciple et le continuateur de Pasteur dans l'étude des microbes du sol, tout comme Metchnikoff l'était dans le domaine de la biochimie microbienne.

Comme Pasteur, Winogradsky ne se souciait pas des théories ni des idées toutes faites. Il appliquait la méthode rigoureuse de l'expérimentation au contrôle des idées préconçues, et tirait des faits d'observation l'explication logique des phénomènes. Il avait horreur des limites rigides qui freinent l'hypothèse et il détestait le dogmatisme. Observateur et expérimentateur avant tout, il savait mieux que quiconque l'inanité des critères *a priori* et la fragilité des théories.

Son dernier travail scientifique, publié par ces *Annales* en février 1952, s'élevait, au nom du bon sens, contre les excès et les vues trop absolues de certaines nomenclatures bactériennes.

Savant foncièrement original, Winogradsky était d'un caractère entier. Il faisait penser aux fleuves de son pays natal dont il avait la puissance irrésistible, la douceur profonde et souvent aussi la subite violence.

Esprit encyclopédique, il avait, avec les ans, limité son horizon à la science et à la musique. Travailleur acharné, levé dès le

jour, il passait ses journées au laboratoire jusque vers 6 heures du soir. Il interrompait alors son travail et se mettait au piano, se confiant à la magie de Schumann, de Beethoven et de Chopin, qu'il jouait toujours de mémoire. La mort de sa femme, en 1939, lui avait porté un coup très rude et avait contribué à l'isoler encore. Les dures conditions de la vie sous l'occupation avaient rendu de plus en plus difficile le travail du laboratoire. Rien n'avait abattu l'ardeur sauvage que Winogradsky consacrait au travail ; lucide jusqu'au bout, il a achevé en solitaire une vie presque centenaire, volontaire et tourmentée, dont les tribulations portent l'empreinte du grand bouleversement par lequel notre époque a marqué la science et l'humanité.

P. L.

LA SPÉCIFICITÉ BIOLOGIQUE DU *PLASMODIUM VINCKEI*, RODHAIN

par J. RODHAIN.

(Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Anvers.
Directeur : A. DUBOIS.)

Dans une courte note parue dans les *Annales de la Société belge de Médecine tropicale* [1] nous avons décrit, sous le nom de *Pl. vinckei*, un hématozoaire endoglobulaire isolé à Kasapa, Haut-Katanga, par l'injection à des souris blanches, de glandes salivaires d'*Anopheles durenii*, Edw.

Notre expérimentation ne portait alors que sur un petit nombre d'animaux. Nous avons, depuis, étendu nos observations et procédé à des épreuves d'immunité croisée entre le nouveau parasite et le *Plasmodium berghei* Vincke et Lips [2].

Ce sont les résultats de ces nouvelles recherches que nous relaterons dans la présente étude. Nous décrirons d'abord l'évolution de l'infection par *Plasmodium vinckei* chez la Souris blanche et chez le *Thamnomys surdaster surdaster*. Nous relaterons ensuite les essais faits chez divers animaux non sensibles au parasite et qui pourtant sont réceptifs au *Plasmodium berghei*. Nous exposerons, enfin, les diverses épreuves d'immunité croisée que nous avons réalisées et dirons quelques mots de la sensibilité du *Pl. vinckei* aux substances antimalariennes.

I. — L'INFECTION PAR *Plasmodium vinckei* CHEZ LA SOURIS BLANCHE.

Du 8 avril 1952 au 27 octobre, nous avons inoculé un total de 70 souris. Tous ces animaux ont reçu la valeur de I à II gouttes de sang, plus ou moins riche en parasites, injectées directement dans le péritoine.

De ces souris, 51 ont succombé à leur infection paludéenne ; 16 ont survécu ; 3 sont mortes, l'une après cinq jours, les deux autres après six jours suivant leur inoculation des suites de complications bactériennes.

Dans le tableau suivant nous résumons la durée de survie des animaux à partir du jour de leur inoculation.

L'examen de ce tableau montre que près de la moitié (46,98 p. 100)

TABLEAU I.

NOMBRE DE JOURS ÉCOULÉS entre l'inoculation et la mort	NOMBRE DE SOURIS MORTES	P. 100
5	1	1,9
6	2	3,9
7	7	13,7
8	6	11,7
9	10	19,6
10	8	15,6
11	3	5,8
12	2	3,9
13	4	7,8
14	5	9,5
18	2	3,9 mortes déparasitées.
20	1	1,9 morte déparasitée.
Total	51	

des animaux succombent à partir du huitième au dixième jour suivant leur inoculation.

Nous avons pu établir la date précise de l'apparition dans le sang des premiers parasites chez 20 souris.

De celles-ci, 7 avaient de très rares parasites dans le sang après deux jours et 13 en avaient dès le troisième jour suivant l'inoculation.

D'autre part, de 17 souris trouvées parasitées au premier examen de sang pratiqué au quatrième jour suivant l'inoculation, les parasites étaient très rares chez 7, rares chez 2, peu nombreux chez 3 et nombreux chez 5.

La précocité de l'apparition des plasmodiums dans le sang ne peut faire préjuger de la rapidité de l'évolution de l'infection. Ainsi, des 7 souris qui dès le deuxième jour suivant l'inoculation montraient déjà un sang parasité, 4 ont survécu, soit plus de 50 p. 100, alors que pour l'ensemble des souris inoculées, le pourcentage de guérison n'est que de 23,23 p. 100.

Près de la moitié des animaux impaludés succombent entre le huitième et le dixième jour suivant l'injection infectante ; la durée du parasitisme sanguin est donc courte, en réalité. En général, après l'apparition des premiers plasmodiums dans le sang, leur nombre augmente rapidement chez les animaux qui meurent, ils finissent par parasiter jusque 80 p. 100 des globules rouges. La durée moyenne du parasitisme aigu sanguin n'excède pas six à sept jours. Il y a des exceptions et certains animaux, après avoir surmonté l'accès aigu, peuvent rester porteurs de parasites pendant un laps de temps dont la durée reste à déterminer. Ainsi, chez la souris 34 nous avons encore trouvé des parasites, très rares dans le sang vingt-cinq jours après l'inoculation et alors qu'elle était cliniquement guérie depuis quinze jours.

L'image sanguine à l'acmé de l'infection est très caractéristique et contraste singulièrement avec celle du *Plasmodium berghei*.

A côté de normocytes parasités en grand nombre, il persiste toujours des globules rouges basophiles qui ne portent des plasmodiums qu'en très faible proportion. Nous avons tenu à dénombrer comparativement chez plusieurs souris à l'acmé de leur infection, les pourcentages respectifs des normocytes et des globules basophiles parasités.

En voici deux exemples :

Souris 47, inoculée le 19 août. Très rares parasites dans le sang le 23. Le 25, encore de rares parasites. Le 26, parasites nombreux. Le 30, parasites très nombreux :

Normocytes parasités : 102, 50,79 p. 100. Réticulocytes parasités, 7.

Normocytes non parasités : 100, 49,21 p. 100. Réticulocytes non parasités, 93.

Meurt le 2 septembre avec hémoglobinurie.

Souris 70, inoculée le 27 octobre. Parasites assez nombreux le 31 octobre. Parasites très nombreux le 3 novembre.

Sur 1 000 globules rouges dénombrés : parasités, 48,9 p. 100. Sur 900 normocytes, 53,2 p. 100 parasités. Sur 100 globules rouges basophiles : réticulocytes parasités, 10 p. 100.

Cette souris guérit.

Si nous considérons l'ensemble des 1 000 globules rouges dénombrés, nous comptons 479 normocytes parasités et seulement 10 globules basophiles, et nous voyons que les normocytes comptent pour 47 p. 100 et les basophiles (réticulocytes) seulement pour 1 p. 100 dans le parasitisme global.

Il n'y avait pas encore, à cette date, de réaction réticulocytaire franche puisque certains auteurs admettent chez la souris normale 10 p. 100 de réticulocytes.

Chez les animaux qui guérissent il survient une réaction réticulocytaire intense en même temps que s'établit la disparition très rapide, en crise, des parasites. Quelquefois ceux-ci (comme dans le cas de la souris 70), parasitant 50 p. 100 des globules rouges circulants, disparaissent en vingt-quatre heures. L'animal qui la veille paraissait devoir périr, indolent, le poil hérissé, est retrouvé regaillardi, alerte, et se rétablit. Très anémié, il peut encore succomber plusieurs jours plus tard, mais déparasité.

Il nous faut dire que les souris qui guérissent ne présentent pas toutes un parasitisme également intense au cours de leur infection. Il y a là des différences qui tiennent à la résistance individuelle des sujets, mais chez toutes la réaction réticulocytaire est forte et assure la guérison.

Ainsi donc, au cours du paludisme déterminé par le *Plasmodium vinckei* chez la souris, la réaction réticulocytaire retarde en quelque sorte la pullulation progressive des hématozoaires. Elle donne le temps à l'organisme de développer ses moyens de

défense qui vont assurer la destruction des plasmodiums. On comprend donc que, pour qu'elle soit efficace, cette réaction doit survenir avant que le nombre de parasites n'ait atteint un pourcentage trop élevé incompatible avec la survie.

Au contraire, au cours du paludisme déterminé par *Plasmodium berghei*, cette même réaction réticulocytaire profite à la multiplication des hématozoaires, ceux-ci parasitant de préférence les érythrocytes jeunes.

A. Baldi [3] a insisté sur cet aspect spécial du comportement du premier plasmodium isolé des rongeurs du Katanga.

Chez un certain nombre d'animaux survient, à l'acmé de leur parasitisme, un accès de réelle hémoglobinurie. Les urines prennent une teinte rosée, quelquefois franchement rouge. Au microscope on ne découvre pas de globules rouges, mais des cylindres granuleux ou épithéliaux.

Les conditions de notre expérimentation ne nous ont pas permis de poursuivre dans les détails l'observation de toutes les souris inoculées. Nous ne pouvons donc donner la proportion des animaux qui ont présenté le symptôme hémoglobinurique.

Parmi les 70 souris mises en expérience, nous avons constaté de l'hémoglobinurie chez 9 animaux. De ceux-ci, 8 ont succombé, 1 seul a guéri.

Voici son observation :

Souris 29. Inoculée le 2 juillet 1952 par sang de souris 27 montrant ce jour des plasmodiums assez nombreux $\pm\pm$.

4 juillet : parasites très rares \pm .

7 juillet : parasites peu nombreux + (un par champ).

10 juillet : parasites nombreux $+++$.

10 juillet : parasites très nombreux $++++$.

12 juillet : urines rosées, souris très malade.

14 juillet : parasites devenus très rares. Réaction réticulocytaire et leucocytaire intense. Souris vive.

16 juillet : plus vu de parasites.

A été réinoculée de *Pl. vinckei*, puis inoculée de *Pl. berghei*. Elle a succombé à l'infection de ce dernier plasmodium sans présenter d'accès hémoglobinurique.

Relevons ici que le syndrome hémoglobinurique n'est pas signalé survenir chez les animaux réceptifs au *Pl. berghei*.

Personnellement, chez les nombreux animaux divers que nous avons infectés de ce dernier hématozoaire, que ce soient des souris, des rats, des hamsters ou des chauves-souris frugivores, nous ne l'avons jamais observé.

A l'autopsie des animaux morts des suites de leur paludisme aigu on trouve la rate très augmentée de volume, de couleur sombre. Chez les souris de 20 g, les dimensions de l'organe dépassent généralement 2 cm de longueur ; elles peuvent excep-

tionnellement atteindre 3 cm sur 1 cm d'épaisseur. Le foie est également hypertrophié, de couleur très sombre dans certains cas presque ardoisée.

Résumant ces données, nous pouvons dire que le *Pl. vinckei* inoculé par voie intrapéritonéale à la souris provoque une infection qui est mortelle dans environ 80 p. 100 des cas.

L'apparition des premiers parasites dans le sang des souris inoculées peut être précoce : deux jours ; elle est généralement la règle après quatre à cinq jours. La majorité des animaux meurent du huitième au dixième jour suivant l'inoculation.

A l'acmé de leur infection les souris peuvent présenter un accès d'hémoglobinurie.

Chez les souris qui guérissent, une réaction réticulocytaire s'installe qui contribue au maintien en vie des animaux, le *Pl. vinckei*, contrairement au *Pl. berghei*, ne montrant aucune prédilection pour parasiter les globules rouges jeunes.

II. — L'INFECTION A *Pl. vinckei*

CHEZ LE *Thamnomys surdaster surdaster*.

Déjà le Dr Vincke avait constaté que la souche de plasmodium qu'il nous avait fait parvenir sous l'appellation Mukata, souris 2 pouvait être transmise au thamnomys. Nous avons pu confirmer le fait. Nos observations ont porté sur 9 thamnomys dont 2 étaient nés à Anvers même et dont 7 provenaient du Katanga.

Comme les souris, ils ont été infectés par inoculation dans le péritoine de sang parasité. Tous se sont montrés réceptifs. Quatre sont morts de leur paludisme, dont un au cours d'un accès d'hémoglobinurie. Un a été tué pour étude des organes, alors qu'il présentait un léger accès d'hémoglobinurie. Son sang était hyperparasité. Cinq ont guéri.

Contrôlée régulièrement, l'apparition des premiers parasites dans le sang se fit chez un animal au troisième jour suivant l'inoculation, et chez les 3 autres au quatrième jour. Chez 6 thamnomys, l'examen du sang se fit tardivement et ne permit pas de conclusion.

Des 3 thamnomys qui ont succombé, l'un est mort onze jours après l'inoculation, un deuxième après six jours avec de l'hémoglobinurie. Quant au troisième, son infection fut prolongée à la suite de l'administration de 20 mg de chloroquine en injection et succomba dix-huit jours après l'apparition des plasmodiums dans son sang.

Chez les animaux qui guérissent survient, comme chez les souris, une augmentation forte des érythrocytes basophiles dont un petit nombre seulement sont parasités.

La disparition des plasmodiums est moins rapide que chez les

souris, elle peut être suivie de rechute et l'animal peut rester porteur de parasites pendant plusieurs semaines. C'est notamment le cas du *thamnomys* 4 inoculé le 20 juin, son sang montre déjà, le 30 juin, de nombreux parasites. Il se déparasite le 14 juillet, mais fait une rechute le 6 août. Le 21 août, il conserve de rares plasmodiums dans son sang.

Ces faits font penser que, dans la nature, le *thamnomys* est un des hôtes naturels de *Pl. vinckei*. Il en est probablement de même de l'*Æthomys* qui nous fut envoyé porteur de rares parasites par le Dr Vincke au début d'avril dernier. Il nous servit à isoler la souche sur souris et vit encore.

Dans les conditions expérimentales, en captivité, le *Thamnomys surdaster surdaster* est réceptif au *Pl. vinckei*. Ce plasmodium peut déterminer chez ce rongeur un paludisme mortel ou une infection chronique au cours de laquelle l'animal est apparemment en bonne santé et reste porteur de parasites. Au cours de l'acmé du parasitisme, les animaux qui succombent peuvent présenter une atteinte d'hémoglobinurie légère.

III. — ESSAIS DE TRANSMISSION DU *Pl. vinckei* A D'AUTRES ANIMAUX RÉCEPTIFS AU *Pl. berghei*.

1° RATS BLANCS. — Le Dr Vincke nous avait signalé que le Rat blanc ne prenait pas le plasmodium qui porte son nom.

Un essai pratiqué chez un animal de six semaines nous confirma la non-réceptivité du rat normal.

Inoculé une première fois le 2 avril et réinoculé le 6 juin, il ne contracta pas l'infection. Injecté de *Pl. berghei* le 8 septembre, il s'infecta.

Nous avons voulu voir comment se comporterait le Rat blanc splénectomisé vis-à-vis du *Pl. vinckei*.

Trois rats blancs de 6 à 7 semaines, splénectomisés, ont reçu chacun, le 29 août, dans le péritoine I goutte de sang de souris (s. 45) très riche en *Plasmodium vinckei* avec les résultats suivants :

Un rat ne montra jamais de parasites dans le sang ;

Chez les deux autres, de très rares plasmodiums étaient présents dans le sang à partir du dix-septième jour suivant l'inoculation. Ils persistèrent, tels, chez l'un pendant onze jours, chez l'autre pendant deux jours seulement.

Du sang parasité prélevé chez ce dernier et inoculé à 2 souris détermina des infections types et mortelles. Deux souris témoins qui avaient été inoculées le même jour que les rats succombèrent respectivement huit et neuf jours après l'inoculation.

Cette expérience montre que chez le rat privé de sa rate, le *Plasmodium vinckei* peut déterminer des infections très légères et de très courte durée.

2° « COTTON RATS ». — Le comportement du « cotton rat » vis-à-vis du *Pl. vinckei* fut trouvé très différent de celui du rat blanc.

Deux « cotton rats » non splénectomisés, inoculés dans le péritoine de I goutte de sang de souris riche en *Pl. vinckei*, ne montrèrent jamais de parasites dans la circulation périphérique.

Deux animaux splénectomisés qui, le 28 juillet, reçurent dans le péritoine II gouttes de sang du thamnomyse 4 montrant ce jour d'assez nombreux *Pl. vinckei*, s'infectèrent tous les deux.

L'un succomba à un paludisme aigu quatorze jours après l'inoculation. Le sang de l'autre resta constamment négatif jusqu'au 22 juillet. lorsqu'il fut réinoculé avec du sang prélevé chez un animal fortement parasité. Il s'infecta, mais fit un paludisme très bénin, les plasmodiums restant toujours très peu nombreux dans le sang.

Le comportement du « cotton rat » splénectomisé vis-à-vis du *Pl. vinckei* se rapproche donc quelque peu de celui qu'il montre vis-à-vis du *Pl. berghei* [4]. L'enlèvement de la rate le rend réceptif au *Pl. vinckei* qui peut déterminer un paludisme mortel ou bénin.

3° HAMSTERS DE SYRIE. — Il est connu que cet animal est très réceptif au *Pl. berghei*. Il nous a intéressé de savoir comment il se comporte vis-à-vis du nouveau plasmodium.

Nos expériences ont porté sur 5 hamsters. Deux normaux inoculés le 6 mai 1952, puis réinoculés le 27 mai, chaque fois avec du sang riche en plasmodiums, n'ont jamais montré de parasites dans leur sang.

Deux hamsters adultes, splénectomisés depuis vingt jours, ont reçu du sang de thamnomyse riche en plasmodiums. Aucun des deux ne contracta l'infection.

Un cinquième, mâle jeune (mi-adulte), inoculé le 25 juin 1952, puis réinoculé le 7 juillet, sans s'infecter, fut splénectomisé le 24 juillet. N'ayant pas présenté de parasites dans son sang jusqu'au 4 août, il fut réinoculé une troisième fois ce jour. Cette fois il s'infecta et le 12 août montra de nombreux plasmodiums dans son sang. Il fut trouvé déparasité le 14 août.

Une nouvelle inoculation de sang parasité pratiquée le 19 août ne fut pas suivie de rechute.

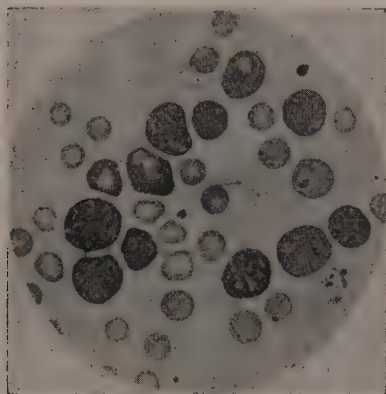
Il servit ensuite pour une épreuve d'immunité vis-à-vis du *Pl. berghei* (voir plus loin).

Ces expériences montrent que le comportement du hamster de Syrie vis-à-vis du *Pl. vinckei* est tout différent de la réceptivité qu'il montre à l'égard du *Pl. berghei*.

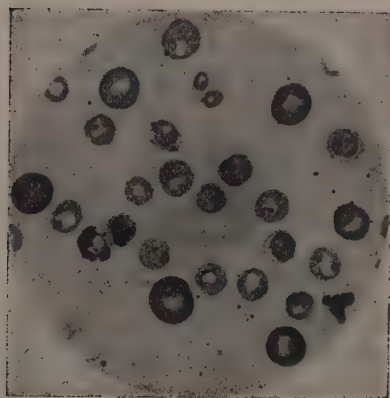
4° *Steatomys opimus gazellae* THOM ET HINT. — Ce petit rongeur africain, facile à manier et très sensible au *Pl. berghei*, s'est montré non réceptif au *Pl. vinckei*.

Notre expérience a porté sur 10 animaux inoculés dont aucun n'a montré l'infection.

5° ROUSSETTES ÉPAULIÈRES *Epomophorus wahlbergi haldemani*



MICROPHOTO 1.



MICROPHOTO 2.

Microphotos de sang de souris infectées de : 1, *Plasmodium berghei*, Vincke et Lips; 2, *Plasmodium vinckei*, Rodhain.

HOLT ET *Micropteropus pusillus* PETERS. — Comme les sleatomys, ces rousseltes sont très réceptives au *Pl. berghei*. Elles se sont montrées résistantes à l'inoculation du *Pl. vinckei* à en juger par l'expérience qui a porté sur deux animaux dont l'un fut inoculé deux fois.

IV. — EXPÉRIENCES D'IMMUNITÉ CROISÉE
ENTRE *Pl. berghei* VINCKE ET LIPS ET *Pl. vinckei* RODHAIN.

1° SOURIS. — Les souris blanches succombant régulièrement à l'infection déterminée par le *Pl. berghei*, il nous a été impossible d'éprouver si les animaux guéris de ce paludisme seraient réfractaires au *Pl. vinckei*.

Ce dernier parasite laissant aux souris infectées une survie de près de 80 p. 100, nous avons pu disposer d'animaux guéris de leur paludisme.

Nous avons donc éprouvé si l'infection subie les rendaient résistantes au *Pl. berghei*.

Dans nos premières expériences nous nous sommes servi de 3 souris qui avaient résisté à une seule inoculation de *Pl. vinckei*.

La souris 1 inoculée du sang de l'aethomys 4283, envoyé par le Dr Vincke le 8 avril 1952, est à l'acmé de son infection le 25 avril ; le 30 elle est déparasitée, mais très anémiée. Elle se remet et est inoculée, en très bon état, le 8 juillet avec du sang de hamster fortement parasité de *Pl. berghei* souche Mukata I.

Le 11 juillet, son sang montre déjà de nombreux plasmodiums et elle meurt le 22 juillet.

La souris 9, inoculée de *Pl. vinckei* le 10 mai, fait une infection type ; son sang est négatif le 29 mai et elle se rétablit. Inoculée comme la souris 1, le 8 juillet, elle succombe, comme celle-ci, à son paludisme le 22 juillet.

Enfin la souris 44 est inoculée le 8 août avec du sang de la souris 42, très riche en parasites. Elle fait une infection à *Pl. vinckei* de moyenne intensité. Du 26 au 29 août son sang est indemne de parasites. Le 30 on trouve encore de très rares parasites. L'animal étant en bon état est inoculé le 2 septembre avec le sang d'une souris infectée de la souche de *Pl. berghei* Mukata II. Elle meurt le 12 septembre de son infection.

Lors de chacune de ces expériences, des souris témoins ont été inoculées, qui sont mortes dans les mêmes laps de temps.

Dans une deuxième série d'essais nous nous sommes servi de souris qui, guéries de leur premier paludisme, avaient été réinoculées de *Pl. vinckei*.

Quatre souris ont été mises en expérience.

Le tableau ci-dessous résume ces essais.

L'examen de ce tableau fait ressortir qu'il y a absence complète de résistance vis-à-vis de *Pl. berghei* chez les 4 souris qui ont subi une double infection de *Pl. vinckei*. Relevons que nous avons employé 4 souches différentes de *Pl. berghei*, ce qui donne à ces essais toute leur valeur. La souche Berghei IV est originaire de près d'Elisabethville, alors que les 3 autres souches ont été isolées bien au Nord : les souches Mukata I et II, par

TABLEAU II. — Souris ayant survécu à deux inoculations de *Pl. vinckei* et inoculées ensuite de *Pl. berghei*.

NUMÉRO D'ORDRE de la souris	DATE de la 1 ^{re} inoculation	RÉSULTAT Examen du sang	DATE de la 2 ^e inoculation	RÉSULTAT Examen du sang	DATE de l'inoculation <i>Pl. berghei</i>	RÉSULTAT
29	2 juillet 1952.	Pos. le 2 juillet. Guérie le 16 juillet.	29 août.	Pos. le 1 ^{er} sept. Guérie le 8 sept.	8 sept. Souche Praomys.	Pos. le 10 sept. Morte le 16 sept.
34	22 juillet.	Pos. le 24 juillet. Sang encore avec très rares parasites le 19 août.	19 août.	Garde de très rares parasites jusqu'au 8 sept.	8 sept. Souche Mukata I.	Pos. le 10 sept. Morte le 29 sept.
36	20 juillet.	Pos. le 24 juillet. Le 19 août encore de très rares plasmodiums.	19 août.	2 août parasites très très rares. Déparasitée le 23 août.	2 sept. Souche Mukata II.	Pos. le 5 sept. Morte le 9 sept.
42	30 juillet.	Pos. le 4 août. Déparasitée le 18 août.	19 août.	Pos. le 30 août. Déparasitée le 8 sept.	8 sept. Souche Berghei IV.	Pos. le 12 sept. Morte le 26 sept.

inoculation de sporozoïtes de *Anopheles durenii* à des rats blancs, la souche Praomys par inoculation du sang d'un praomys trouvé naturellement infecté.

Il nous faut encore insister sur quelques particularités observées chez les souris qui ont subi une deuxième inoculation de *Pl. vinckei*.

Le sang de la souris 29 était indemne de plasmodiums depuis trente-quatre jours lorsqu'elle fut inoculée pour la deuxième fois. De rares parasites schizontes et gamètes, réapparurent dans la circulation durant cinq jours seulement. Le comportement de la souris 34 fut quelque peu différent. Elle fit d'abord un paludisme très grave à la suite de sa première inoculation. De rares parasites persistaient dans son sang lorsqu'elle fut réinoculée. Les plasmodiums augmentèrent en nombre six jours après pour diminuer à partir du huitième jour; mais ils étaient toujours présents dix-neuf jours après la deuxième inoculation.

L'état général de l'animal se maintenait d'ailleurs bon, ce qui nous a permis de l'injecter de *Pl. berghei*. Le paludisme déterminé par ce dernier évolua rapidement vers la mort en dix jours.

La souris 36 se comporta sensiblement de même que la souris 29, comme aussi la souris 42. La deuxième inoculation de *Pl. vinckei* fut suivie d'une réapparition dans le sang de rares parasites durant à peine cinq jours.

Nous avons insisté sur ces détails qui montrent qu'une première infection à *Pl. vinckei* développe chez la souris un

degré de résistance vis-à-vis d'une réinfection. Celle-ci peut, pourtant, être suivie d'un parasitisme qui, de faible intensité, se maintient durant plus de quinze jours, l'animal restant dans un état de prémunition.

Au cours de cette période, des schizontes et des gamètes peuvent persister dans le sang et nous y avons rencontré des macrogamètes ne présentant plus trace de vacuoles.

2° AUTRES ANIMAUX. — A ces expériences cruciales nous pouvons ajouter le résultat obtenu chez le hamster jeune qui, inoculé à 3 reprises de sang riche en *Pl. vinckei*, finit par contracter un parasitisme sanguin fugace. Splénectomisé et réinoculé de *Pl. vinckei*, son sang resta indemne de plasmodiums ; il succomba en dix jours lorsqu'infecté de *Pl. berghei*.

Une chauve-souris, *Epomophorus haldemani hollowell* qui, elle aussi, subit deux inoculations successives de sang riche en *Pl. vinckei* sans présenter de parasites dans le sang, succomba de même à l'infection provoquée de *Pl. berghei*.

Ces résultats viennent appuyer les différences spécifiques des deux plasmodiums des rongeurs du Haut Katanga.

Nous aurions voulu terminer cette étude par des essais de chimiothérapie, mais le manque de souris en empêcha la réalisation. Nous avons confié ces essais au Dr Parmentier fréquentant notre laboratoire. Les quelques essais incomplets qu'il put réaliser indiquent pourtant que le *Pl. vinckei* ne se comporte pas comme le *Pl. berghei*, vis-à-vis de certaines substances actives contre les plasmodiums.

Disons en terminant que les essais que nous avons entrepris avec la collaboration de notre collègue M. Wanson, dans le but de voir si le *Pl. vinckei* pouvait évoluer chez divers moustiques, *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* et *Anopheles maculipennis atroparvus* n'ont abouti qu'à des résultats négatifs.

Plasmodium vinckei, comme *Plasmodium berghei*, semble étroitement adapté à *Anopheles duren*i qui, lui, ne s'élève pas en captivité.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Plasmodium vinckei détermine chez la Souris blanche une infection paludéenne aiguë qui tue 80 p. 100 des animaux, dont la majorité succombe entre le huitième et le dixième jour après l'inoculation intrapéritonéale des parasites. Les animaux qui périssent peuvent, à l'acmé de leur parasitisme, présenter un accès d'hémoglobinurie.

Contrairement au *Plasmodium berghei* qui parasite avec prédilection les érythrocytes jeunes, le *Plasmodium vinckei* n'infecte les réticulocytes que dans une proportion ne dépassant pas

10 p. 100. Chez les souris qui guérissent, la disparition des plasmodiums du sang se fait sous forme de crise et est accompagnée d'une poussée de réticulocytes intense qui permet la survie des animaux, même alors que 50 p. 100 des normocytes sont parasités.

Le *Thamnomys surdaster surdaster* est réceptif au *Pl. vinckei*, mais beaucoup plus résistant que la Souris. Le Rat blanc, le « Cotton rat », le Hamster de Syrie, le *Steatomys*, l'*Epomophorus haldemani* Hollowel non splénectomisés ne sont pas réceptifs au *Pl. vinckei*. Splénectomisé, le « cotton rat » s'infecte et peut faire un paludisme mortel, le hamster une infection fugace très légère.

Les souris guéries d'une première infection sont prémunies contre une deuxième inoculation, mais restent normalement sensibles au *Pl. berghei*.

Les deux plasmodiums des rongeurs du Haut Katanga, transmissibles à la Souris blanche, morphologiquement différents, présentent aussi au point de vue biologique un comportement distinct.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. RODHAIN. Un deuxième plasmodium parasite de rongeurs sauvages du Katanga. *Ann. Soc. Belge de Méd. Trop.*, 1952, **32**, 275.
- [2] I. VINCKE et M. LIPS. Un nouveau plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo : *Pl. berghei* n. sp. *Ann. Soc. Belge de Méd. Trop.*, 1948, **28**, 97.
- [3] A. BALDI. Sul quadro anemico nell'infezione da *Pl. berghei*, Vincke et Lips. *Riv. Malariol.*, 1950, **29**, 349.
- [4] J. RODHAIN. Le comportement du « Cotton rat » vis-à-vis du *Plasmodium berghei*. *Ann. Soc. Belge de Méd. Trop.*, 1949, **29**, 483.

TECHNIQUE
DE LA DÉVIATION DU COMPLÉMENT SUR PLAQUES
DANS LES MALADIES A VIRUS.
APPLICATION AUX VIRUS DU GROUPE COXSACKIE

par P. LÉPINE, V. SAUTTER, J. DELPY et F. ARTZET (*).

(Institut Pasteur. Service des Virus.)

Le perfectionnement progressif des méthodes sérologiques a permis l'application des méthodes de déviation du complément aux principales affections à virus. Il en résulte une simplification considérable, ainsi qu'une précision améliorée, du diagnostic qui, auparavant, ne reposait que sur des procédés compliqués, comme l'identification d'un virus après isolement préalable sur animal réactif, ou qui échappait complètement aux méthodes de laboratoire s'appuyant sur des réactions spécifiques.

Mais la pratique des réactions sérologiques en matière de maladies à virus se heurte à des obstacles considérables : le taux généralement peu élevé des anticorps sériques à la date plus ou moins précoce de leur apparition et leur labilité d'une part, la difficulté de préparation des antigènes, pauvres en substances spécifiques et trop riches en protéines étrangères d'autre part, le prix de revient généralement très élevé des réactions, et enfin les dangers de manipulation lorsque l'on emploie des antigènes virulents.

Pour certains groupes de virus ces difficultés ont pu être tournées, au moins en grande partie, et depuis plusieurs années déjà, des méthodes sérologiques, empruntant la technique classique des déviations du complément, habituellement selon la méthode de Kolmer modifiée, ont été mises au point et sont couramment appliquées avec des résultats satisfaisants. C'est le cas, par exemple, des virus du groupe psittacose-ornithose-lymphogranulomatose vénérienne.

Cependant, les mêmes obstacles, sensibilité insuffisante et nécessité de quantités trop grandes d'antigènes difficiles à préparer, ont fait opposition à l'emploi pratique des mêmes

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 février 1953.

méthodes pour le diagnostic d'autres maladies comme les infections poliomyélitiques ou à virus coxsackie.

Il a fallu étudier d'autres méthodes, plus économiques et plus précises, représentées par les déviations du complément exécutées sur plaques.

Nous avons, depuis un an, consacré à cette question une grande partie de l'activité du laboratoire de diagnostics du Service des Virus, et nous avons abouti à mettre au point un test sur plaques par la déviation du complément, applicable à toutes les affections à virus pour lesquelles il est possible de préparer des antigènes spécifiques.

Ce test est inspiré dans son principe de celui décrit par Fulton et Dumbell [1] pour le virus grippal. La méthode de ces auteurs a été appliquée au groupe des virus coxsackie par Kraft et Melnick [2], et à la déviation du complément dans la poliomyélite par Svedmyr, Enders et Holloway [3]. Elle a l'avantage de n'utiliser que des quantités minimales d'antigène et de sérum. Les modifications apportées par nous tendent à simplifier la technique, afin d'obtenir avec un matériel et un personnel réduits des résultats ayant, à un degré suffisant, la précision indispensable à l'interprétation correcte des résultats.

La description qui suit est consacrée à l'exécution du test dans le cas des infections à virus coxsackie. Mais il est évident que, mise à part la préparation de l'antigène, variant avec chaque virus, la même technique générale est applicable en pratique à tous les virus qui ont été inoculés à l'animal, aux œufs embryonnés, ou obtenus en culture *in vitro*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Antigènes. — Comme source d'antigène, sont utilisés des souriceaux suisses âgés de 48 heures, inoculés par voie sous-cutanée, avec une suspension virulente à 10^{-1} . On a soin d'ajouter 200 unités de pénicilline et 1 mg de streptomycine à chaque centimètre cube d'émulsion, et de pratiquer des cultures aérobies et anaérobies de contrôle.

Les animaux sont sacrifiés après quarante-huit heures, à la condition toutefois que la moitié au moins présente des signes de maladie. Endormis à l'éther, les souriceaux sont saignés, puis pelés, éviscérés, et le reste utilisé comme matériel de base pour la préparation de l'antigène, par la méthode de J. Casals [4] ou par la méthode à la protamine-éther [5]. Au terme de leur préparation, les antigènes sont stérilisés aux rayons ultra-violets et soit stockés à -70° jusqu'à leur utilisation, soit lyophilisés, sans perte appréciable du pouvoir antigène.

Sérums. — Les sérums de référence sont obtenus en inoculant à des souris suisses adultes, par voie intrapéritonéale, $0,25 \text{ cm}^3$

d'émulsion de souriceaux virulente pendant trois semaines, à raison de trois injections par semaine. La concentration des émulsions va en croissant de 5 p. 100 la première semaine, à 10 p. 100 la deuxième et 20 p. 100 la troisième. Les animaux sont laissés dix jours au repos, puis saignés à jeun au cœur ; le sérum est ensuite prélevé, centrifugé, réparti en tubes scellés

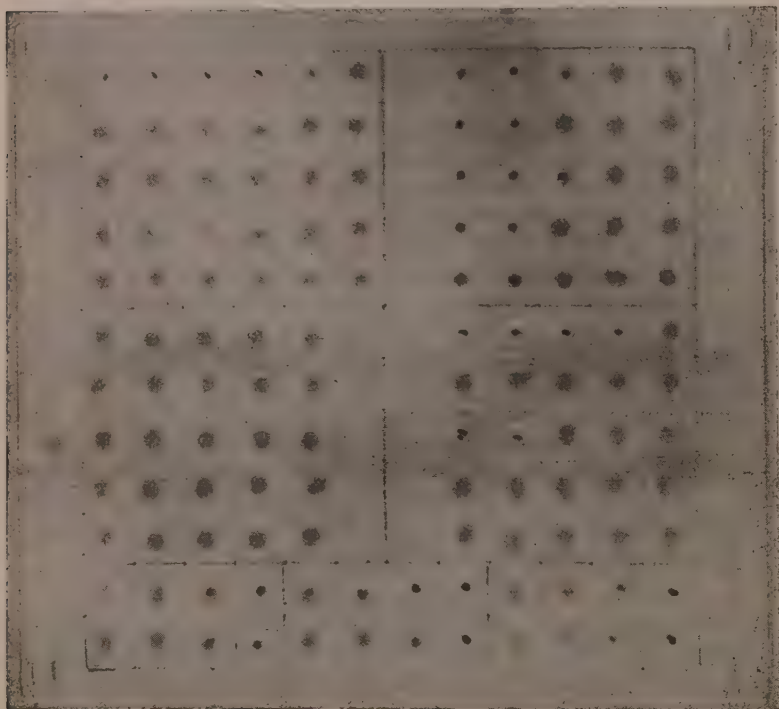


FIG. 1. — Photographie d'une réaction de déviation du complément pour la coxsackie, effectuée sur plaque de matière plastique. L'opération porte sur quatre sérums différents. Certains groupes de carrés ont été délimités sur la plaque de matière plastique au moyen de traits de crayon gris, afin de rendre plus claire l'explication du schéma donné dans la figure 2.

et stocké à -20°C . Les sérums de malades sont, eux aussi, centrifugés et stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Au moment de l'emploi, tous les sérums sont décomplémentés par chauffage au bain-marie à 56° pendant trente minutes.

Complément. — On utilise comme complément des lots de sérums de cobayes sains, centrifugés et stockés à -70°C , ou du complément lyophilisé.

Diluent. — Le diluent utilisé comme donnant les meilleurs résultats, est le tampon au véronal [6] de formule suivante :

NaCl	85 g
Acide 5-5 diéthylbarbiturique	5,75 g
5-5 diéthylbarbiturate de soude	3,75 g

Dissoudre l'acide dans 500 cm³ d'eau tridistillée chaude. Ajouter les autres composants et compléter à 2 000 cm³. Ajouter ensuite :

MgCl ₂ , 6 H ₂ O	1,68 g
CaCl ₂	0,28 g

Autoclaver vingt minutes à 105° et garder à +4°. Au moment de l'emploi, diluer à 1:5 dans de l'eau tridistillée.

Hématies. — Les hématies de mouton sont utilisées fraîches ou conservées dans la solution d'Alsever. Au moment de l'emploi, elles sont lavées trois fois de suite dans du tampon au véronal, puis diluées à 1 p. 100 et sensibilisées avec une quantité égale de sérum hémolytique dilué de façon à renfermer, par unité de volume, deux unités hémolytiques, sans dépasser cette teneur en hémolysine qui est la dose sensibilisante facilitant l'amasement des hématies et, partant, la lecture.

Plaques. — Le matériel utilisé est du plexiglass en feuilles Alsthom M 222 ou NP.S 70 (Perspex) de 3 mm d'épaisseur. Les feuilles sont découpées en plaques rectangulaires de 324 mm sur 294 mm. Sur la plaque est gravé un quadrillage de 264 mm de côté, comportant 144 carrés de 22 mm. Les carrés sont numérotés de 1 à 12, en chiffres romains dans la marge gauche verticale, chaque chiffre correspondant à une ligne horizontale de carrés, et en chiffres arabes dans la marge supérieure horizontale, chaque chiffre correspondant à une ligne verticale de carrés. La plaque comporte, de plus, 4 pieds en plexiglass de 10 mm de hauteur, formés de cubes de plexiglass de 10 mm de côté, collés sous les 4 angles. Le quadrillage et le numérotage sont gravés sur l'envers de la plaque, afin de faciliter le nettoyage de la surface où sont déposées les gouttes, qui doit être parfaitement lisse et polie.

Pipettes. — Elles sont faites avec des tubes de verre à pipettes Pasteur de petit calibre, finement étirés. L'effilure est introduite dans une fente calibrée, ayant 0,8 mm de largeur exactement, pratiquée dans une feuille de dural de la dimension d'une carte à jouer de 1,5 mm d'épaisseur placée verticalement sur un support approprié, et un trait est fait à la lime à verre, au ras de la feuille métallique du côté effilé de la pipette ; celle-ci est ensuite retirée de la fente et coupée d'un coup sec. Il est indispensable de retirer la pipette de la fente avant de la couper, car sans cette précaution, le trait de coupure n'est pas franc et

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I												
II												
III												
IV												
V												
VI												
VII												
VIII												
LX												
X												
XI												
XII												

FIG. 2. — Reproduction schématique de la réaction illustrée par la figure 1.

Les traits gras divisent la plaque en quatre grands carrés surmontant trois rectangles. Chacun des grands carrés correspond aux réactions effectuées avec les différents antigènes pour un sérum donné. La disposition et les réactifs sont les mêmes dans chacun de ces carrés qui ne diffèrent que par le sérum essayé. Par exemple, dans le premier carré en haut et à gauche :

Rang I, carrés 1 à 5, premier sérum en présence de l'antigène coxsackie type 1 ;

Rang II, carrés 1 à 5, premier sérum en présence de l'antigène coxsackie type 2 ;

Rang III, carrés 1 à 5, premier sérum en présence de l'antigène coxsackie type 3 ;

Rang IV, carrés 1 à 5, premier sérum en présence d'un antigène normal (tissu de souriceau non inoculé) ;

Rang V, carrés 1 à 5, témoins (sérum du malade et réactifs sans antigène).

La disposition est la même dans le grand carré en bas et à gauche pour un deuxième sérum et dans les grands carrés de droite en haut et en bas.

En procédant de cette manière à la disposition des sérums, si le premier et le deuxième sérum, ou le troisième et le quatrième, sont respectivement les sérums précoce et tardif du même malade, il est facile de voir, à la lecture des colonnes verticales correspondantes, s'il y a eu ou non variation dans le taux de la déviation du complément entre le premier et le deuxième prélèvement de sérum du malade.

la pipette est inutilisable. Ces pipettes distribuent environ 18 mm³ par goutte. Un lot de pipettes, testé avec du tampon au véronal par pesée de L gouttes, nous a donné une marge d'erreur de 0,6 mm³ par goutte, ce qui est en accord avec la tolérance admise par Kraft et Melnick [2]. Les variations dues aux différences de viscosité des sérums sont faibles, et négligeables aux dilutions employées.

Bottes étanches. — Afin d'éviter l'évaporation des gouttes à la glacière ou au bain-marie, les plaques sont disposées l'une sur l'autre dans des boîtes en tôle galvanisée, dont les dimensions sont respectivement : longueur, 370 mm ; largeur, 320 mm ; hauteur, 200 mm pour celles allant à la glacière et : longueur, 370 mm ; largeur, 320 mm ; hauteur, 120 mm pour celles mises au bain-marie. Chacune comporte un rebord de 30 mm garni de bandes caoutchoutées collées, sur lequel vient s'emboîter un couvercle débordant, d'un poids assurant une étanchéité suffisante. Le fond de chaque boîte est garni de papier filtre imbibé d'eau afin de maintenir un degré hygrométrique élevé. La surface interne du couvercle est munie d'une feuille de papier filtre fixée avec un adhésif, destinée à éviter que l'eau de condensation ne coule sur les plaques.

Bacs pour la distribution des gouttes. — Toute la réaction ayant lieu à froid, et la distribution des gouttes prenant un certain temps, il est indispensable d'éviter le réchauffement des différents constituants pendant la préparation des tests. Pour cela, des bacs en acier inoxydable sont garnis de cubes de glace ; au

Suite de la légende de la figure 2.

Dans les rectangles du bas, de gauche à droite :

Rang XI, carrés 1 à 4, pouvoir anticomplémentaire du premier sérum ;
rang XII, carrés 1 à 4, pouvoir anticomplémentaire du deuxième sérum ;

Rang XI, carrés 5 à 8, pouvoir anticomplémentaire du troisième sérum ;
rang XII, carrés 5 à 8, pouvoir anticomplémentaire du quatrième sérum ;

Dernier rectangle en bas à droite, ligne du haut :

Rang XI, carrés 9 à 12, titre du complément avant distribution ;

Rang XII, carrés 9 à 12, titre du complément après distribution.

Enfin la colonne verticale 6 correspond à l'essai du pouvoir anticomplémentaire des différents antigènes employés dans les rangs I à V ainsi que dans les rangs homologues des autres grands carrés.

Interprétation. — La réaction a été correctement exécutée : les antigènes ne sont pas anticomplémentaires (colonne 6) ; le complément a gardé la même valeur du commencement à la fin de la distribution (rectangle inférieur à droite) ;

Le premier sérum (grand carré en haut à gauche) dévie le complément en présence de l'antigène coxsackie type 1 ;

Le deuxième sérum (grand carré en bas à gauche) est entièrement négatif ;

Le troisième sérum (grand carré en haut à droite) est anticomplémentaire et inutilisable ;

Le quatrième sérum (grand carré en bas à droite) dévie fortement le complément en présence de l'antigène coxsackie type 1 et le dévie également, mais faiblement en présence de l'antigène type 3.

fond du bac, 4 bouchons supportent une feuille de dural de $300 \times 200 \times 5$ mm recouverte de papier filtre, sur laquelle repose la plaque de la réaction. Celle-ci est ainsi maintenue durant les manipulations à une température suffisamment basse, sans cependant que sa surface se couvre de buée provoquant l'étalement de la goutte. Tous les réactifs, préalablement refroidis, sont conservés dans un récipient plongeant dans l'eau glacée pendant toute la durée des manipulations.

Déviation du complément. — Les sérums décongelés et décomplémentés sont dilués en tubes avec du tampon au véronal refroidi. *Aucun sérum n'est utilisé à une dilution inférieure au 1:4*, les réactions obtenues étant considérées comme non spécifiques au-dessous de ce taux. Pour les sérums à essayer, 5 dilutions allant de 1:4 à 1:64 sont préparées, en utilisant $0,2 \text{ cm}^3$ de sérum pur. Les sérums de référence, pour les témoins positifs et négatifs, sont dilués de 1:4 à 1:1 024. Toutes les dilutions sont gardées en glacière jusqu'au moment de l'emploi.

Le complément, dont le titre pour un lot donné a été établi au préalable, est dilué en tubes de façon à contenir 2,5 unités par goutte. Les pouvoirs anticomplémentaires des sérums et des antigènes sont établis sur le même complément, pur et au 1:2, 1:4 et 1:8.

L'unité d'antigène pour un lot donné est définie comme étant la dilution la plus forte qui dévie totalement le complément en présence de la plus forte dilution du sérum de référence.

Pour les virus coxsackie, nous n'utilisons actuellement que trois antigènes spécifiques préparés à partir des souches dont les prototypes sont :

France 50.328 (antigéniquement semblable à Albany, groupe A, type I, TT) ;

France 50.358 (antigéniquement semblable à Albany, groupe A, type II, FL) ;

Albany, groupe A, type III, OL (reçue du Dr Dalldorf).

Chaque test journalier comporte l'emploi d'un certain nombre de plaques, fonction du nombre de sérums à essayer, plus une plaque commune pour les témoins.

Plan d'une plaque. — Quatre sérums différents sont essayés sur chaque plaque (il est indispensable que la même plaque porte les différents échantillons, précoces et tardifs, d'un même malade). Les sérums sont distribués en premier et dans le sens vertical sur cinq carrés (3 pour les antigènes spécifiques, 1 pour l'antigène normal et 1 comme témoin sérum). Une seule pipette est employée pour toutes les dilutions d'un même sérum, en prenant soin de commencer par la plus étendue. C'est ainsi que les cinq premiers carrés du rang vertical 5 reçoivent 1 goutte de la dilution 1:64 du sérum n° 1 ; la pipette est soigneusement vidée,

puis rincée deux fois dans la dilution 1:32, que l'on répartit dans le rang 4, et ainsi de suite jusqu'au rang 1 qui reçoit la dilution 1:4; sans vider la pipette on distribue alors 1 goutte de cette dilution dans les quatre premiers carrés du rang horizontal XI pour mettre en évidence le pouvoir anticomplémentaire du sérum.

Le sérum n° 2 est distribué de la même façon au-dessous du n° 1, c'est-à-dire dans les cinq premiers rangs verticaux et sur les rangs horizontaux VI à X. Le contrôle du pouvoir anticomplémentaire occupe les quatre premiers carrés du rang XII.

Les sérums n° 3 et n° 4 sont distribués l'un au-dessous de l'autre dans les rangs verticaux 8, 9, 10, 11 et 12 en commençant par le rang 12 pour la dilution 1:64; leurs pouvoirs anticomplémentaires occupent respectivement les carrés 5, 6, 7 et 8 des rangs horizontaux XI et XII.

Le diluent au véronal est distribué à la suite des sérums : 1 goutte dans les cinq premiers carrés du rang vertical 6 (témoin antigène à ne faire qu'une fois par plaque), 1 goutte dans les rangs horizontaux V et X (témoin sérum à répéter chaque fois), 1 goutte dans les huit premiers carrés des rangs XI et XII (pouvoir anticomplémentaire des sérums), deux gouttes dans les quatre derniers carrés des rangs XI et XII (titres du complément avant et après sa distribution).

Puis les antigènes sont distribués horizontalement :

Antigène type I dans les rangs I et VI;

Antigène type II dans les rangs II et VII;

Antigène type III dans les rangs III et VIII;

Antigène normal dans les rangs IV et IX.

(Les rangs V et X ont déjà reçu du véronal.)

Le complément est réparti en dernier : sorti au dernier moment de la glacière, le portoir est constamment maintenu dans un bac de glace; une pipette différente est employée pour chaque dilution de complément. Afin de mettre en évidence une éventuelle détérioration du complément pendant la distribution, il est titré au début et à la fin de l'opération; pour ce faire, 1 goutte de chacune des dilutions : pur (2,5 unités), 1:2, 1:4 et 1:8 est déposée dans les quatre derniers carrés du rang XI; le complément à 2,5 unités est ensuite distribué dans les rangs horizontaux I à X et dans les premier et cinquième carrés des rangs XI et XII; les dilutions 1:2, 1:4 et 1:8 sont alors réparties respectivement dans les carrés 2, 3, 4, 6, 7 et 8 des rangs XI et XII; enfin, le titre final du complément prend place dans les quatre derniers carrés du rang XII.

La plaque est alors déposée dans la boîte étanche à la glacière.

Plaque témoins positifs et négatifs. — Elle comporte aussi le contrôle des pouvoirs anticomplémentaires des antigènes et des

sérums de référence. Les dilutions de chacun des sérums spécifiques sont distribuées dans les trois premiers rangs horizontaux sur 9 carrés. I goutte de la dilution 1:4 de chaque sérum est déposée dans les quatre premiers carrés des rangs VII, VIII et IX. I goutte de chaque dilution de sérum normal est répartie dans les rangs horizontaux IV, V, VI sur 9 carrés en commençant toujours par la dilution la plus forte, le pouvoir anticomplémentaire de la dilution 1:4 prenant place dans les quatre premiers carrés du rang X. Ensuite le véronal est distribué à raison de I goutte dans les huit premiers carrés des rangs VII à X (pouvoir anticomplémentaire des sérums et des antigènes) et de II gouttes dans les huit premiers carrés du rang XI (contrôles du complément).

Les antigènes sont distribués horizontalement :

Type I dans les rangs I et IV et carrés 5 à 8 du rang VII ;

Type II dans les rangs II et V et carrés 5 à 8 du rang IX ;

Type III dans les rangs III et VI et carrés 5 à 8 du rang X.

Enfin, le complément est distribué comme pour les plaques test en commençant et en terminant par les contrôles.

Toutes les plaques ayant été distribuées et placées en pile les unes sur les autres dans le premier bac étanche à la glacière, une plaque ne portant pas de gouttes est ajoutée en dernier au sommet de la pile. Cette précaution a pour but : 1° d'éviter que de l'eau de condensation ne tombe du couvercle sur les plaques test ; 2° de rendre les conditions d'évaporation et de température aussi semblables que possible pour toutes les plaques.

Le bac est laissé la nuit à la glacière à +4° C ; le lendemain les plaques sont retirées, et II gouttes d'hématies sensibilisées sont ajoutées dans chaque carré ; après quoi les plaques sont disposées dans le deuxième bac étanche au bain-marie à 37°. Le résultat est lu après quarante-cinq minutes en examinant les plaques par transparence. Le degré d'hémolyse est noté de 4 (pas d'hémolyse) à 0 (hémolyse totale).

PRÉCAUTIONS PARTICULIÈRES.

1° *Nettoyage des plaques.* — Un soin tout particulier doit être apporté à cette opération, toute trace d'impureté entravant fâcheusement et la distribution des gouttes et l'amasement ultérieur des hématies. Après avoir été soigneusement nettoyées avec une solution de « teepol », les plaques sont rincées à l'eau du robinet, puis plongées dans une solution d'alcool chlorhydrique (alcool 90°, 45 cm³ ; ClH ordinaire, 1 cm³ ; H₂O q. s. p. 100 cm³) et doucement frottées avec un tampon de coton. Après avoir trempé dans cette solution environ dix minutes, elles sont longuement rincées à l'eau du robinet. Dès ce moment, il est important de ne plus

frotter les plaques, car elles s'électrisent très facilement, ce qui rend la distribution des gouttes impossible : en effet, les gouttes sont alors attirées hors de la pipette par l'attraction électrostatique, avant d'avoir atteint leur volume normal. Les plaques sont essorées entre deux linges propres, puis séchées à l'air comprimé, et rangées entre deux feuilles de papier filtre à l'abri des poussières jusqu'au moment de l'emploi.

2° *Distribution des gouttes.* — S'assurer que le trait de coupure de la pipette est bien net ; tenir la pipette verticale ; la hauteur de la chute de la goutte doit être de 1 cm à 1,5 cm. Il arrive parfois, et ceci semble être en relation avec les conditions atmosphériques, que les gouttes ricochent l'une sur l'autre au lieu de se fondre ; il suffit en général d'augmenter la hauteur de chute pour que tout rentre dans l'ordre. Les plaques se couvrent parfois de buée en certains points et en certaines circonstances : 1° lors de la distribution des gouttes, quand la plaque est trop froide : les gouttes s'étalent alors. Il faut sortir rapidement la plaque du bac refroidi et disposer sous elle une deuxième feuille de papier filtre ; 2° après le bain-marie, juste avant la lecture : il faut alors se garder d'agiter la plaque car les gouttes coulent et se mélangent. Il suffit de laisser la plaque quelque temps à la température du laboratoire pour voir la buée se dissiper.

3° *Lecture du test.* — La lecture correcte du test est fonction de l'amasement des hématies non hémolysées au centre de la goutte. Fulton et Dumbell [4] font remarquer que ce phénomène est probablement dû au fait que la dose de sérum hémolytique employée pour sensibiliser les hématies est proche du titre agglutinant de ce sérum. Le plus souvent, cependant, cet amasement ne se produit pas spontanément ; il faut alors faire osciller pendant quelques minutes la plaque de telle façon que les gouttes se trouvent animées d'un mouvement circulaire qui assure le rassemblement des hématies en un point central. Ce phénomène semble plus rapide si la plaque est préalablement refroidie à la glacière à +4° pendant quelques minutes.

Nous avons trouvé particulièrement commode, pour lire le test, de tenir la plaque à environ 10 à 15 cm au-dessus d'un négatoscope à lumière blanche diffuse, disposé horizontalement. Cet artifice permet d'apprécier, rapidement et beaucoup plus finement, le degré d'hémolyse et de mettre en évidence des traces d'hématies non hémolysées. De toute façon, l'examen au-dessus de la source lumineuse diffuse du négatoscope facilite la lecture et rend l'aspect des gouttes, hémolysées ou non, remarquablement frappant. Les lectures faites sont immédiatement notées.

Nous répétons ici que la même technique, à quelques variantes près tenant surtout à la nature des antigènes, est applicable aux autres infections à virus : poliomyélite, grippe, oreillons, psitta-

cose-ornithose. Nous estimons que sa simplicité et sa précision en font la méthode de choix, la plus économique, pour la sérologie des affections à virus.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. FULTON et K. R. DUMBELL. *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 97.
- [2] L. M. KRAFT et J. L. MELNICK. *J. exp. Med.*, 1950, **92**, 483.
- [3] A. SVEDMYR, J. F. ENDERS et A. HOLLOWAY. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1952, **79**, 296.
- [4] J. CASALS, P. K. OLITSKY et L. C. MURPHY. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **72**, 637.
- [5] J. DELPY. *Ces Annales*, 1953, **84**, 780.
- [6] M. M. MAYER, A. G. OSLER, O. G. BIER et M. HEIDELBERGER. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 535.

INFLUENCE FAVORISANTE DU VIRUS GRIPPAL SUR LES INFECTIONS ASSOCIÉES

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

par PAUL BORDET et LISE QUERSIN-THIRY.

(Institut Pasteur de Bruxelles.)

Dans un mémoire antérieur [4], nous avons décrit les effets de l'inoculation intrapéritonéale de virus grippal au cobaye, et mis en évidence l'augmentation de réceptivité que cette inoculation détermine à l'égard du bacille de Pfeiffer introduit par la même voie. Rappelons brièvement que l'injection de 20 000 unités hémagglutinantes de virus fait apparaître régulièrement un exsudat péritonéal abondant et fluide, sortant sous pression si l'on ponctionne le péritoine vingt-quatre à quarante-huit heures après l'inoculation, et qui, à l'examen microscopique, se caractérise par la grande fréquence des images de pycnose leucocytaire. Observés dans la cavité péritonéale, milieu bien aseptique, d'un animal non réceptif à l'infection grippale et chez lequel le virus ne se multiplie pas, ces effets de nature manifestement toxique contribuent à éclairer la physiopathologie de la grippe. Ils semblent permettre, en particulier, d'expliquer par la seule toxicité du virus grippal les formes fulgurantes de grippe telles qu'on en a observées au cours de la pandémie de 1918-1919 et qui, à l'autopsie, montrent des poumons gorgés d'exsudat séreux. Les expériences relatées dans ce mémoire précédent montraient que les cobayes ayant reçu une telle dose de virus manifestent, à l'égard du bacille de Pfeiffer introduit une demi-heure plus tard sous forme de culture en bouillon-sang âgée de 24 heures, une sensibilité quatre à six fois supérieure à celle des animaux témoins.

Poursuivant ces recherches, nous avons enregistré des résultats nouveaux, que nous consignons dans ce deuxième mémoire.

Tout d'abord, nous avons constaté que la différence de réceptivité au bacille de Pfeiffer, entre cobayes témoins ou inoculés de virus grippal, se montre beaucoup plus considérable que dans nos expériences antérieures si, au lieu d'employer des cultures de cette bactérie en bouillon-sang, on l'inocule à l'état de culture sur milieu solide.

La souche de bacille de Pfeiffer utilisée est la même que celle ayant servi aux essais précédents. En vue de son inoculation, des cultures de vingt-quatre heures en couche continue sur gélose au sang sont délayées, après élimination du liquide de fond, dans du bouillon dilué au vingtième en solution physiologique. Les cobayes utilisés sont toujours de poids compris entre 300 et 325 g. L'éluat de virus, titrant le plus souvent 8 000 unités hémagglutinantes par millilitre, est injecté à raison de 20 000 unités, soit habituellement sous un volume de 2,5 ml. Les cobayes devant servir de témoins reçoivent un même volume de solution physiologique additionné du produit de laquage d'hématies en quantité qui lui confère une teinte rosée au moins égale à celle de l'éluat virulent. Nous ne rappellerons plus ici le mode de préparation de cet éluat : il a été décrit en détail dans notre précédent mémoire.

Selon nos essais, qui ont porté sur 33 animaux, la dose de bacille de Pfeiffer mortelle pour le cobaye témoin se situe aux environs de 1/4 de culture sur gélose au sang, dose qui a tué la moitié du nombre des cobayes éprouvés (3 sur 6) ; la mort a suivi régulièrement l'injection d'une dose supérieure à 1/2 culture ; par contre, l'injection de 1/8 de culture n'a tué que 2 cobayes sur 7, et l'injection de 1/16 de culture, ou d'une dose moindre, a toujours été suivie de guérison. Chez les cobayes inoculés une demi-heure plus tôt de virus élué (20 000 unités), la dose mortelle, dans nos essais qui ont porté sur un total de 42 animaux, fut le plus souvent inférieure à 1/1 000 de culture, dose qui a tué les deux tiers des cobayes inoculés (6 sur 9). En réalité, cette proportion de 2 morts sur 3 s'est vérifiée pour tous les cobayes (26) qui, après inoculation de virus grippal, ont reçu des doses de bacille de Pfeiffer comprises entre 1/250 et 1/4 000 de culture ; la mortalité est constante pour des doses plus élevées. L'injection de 1/1 000 de culture se montre donc plus souvent mortelle, pour le cobaye inoculé de virus grippal, que ne l'est celle de 1/4 de culture pour le cobaye témoin. On s'assure, bien entendu, par d'autres témoins, que la dose de virus inoculée (20 000 unités) est régulièrement bien tolérée, ce qui, du reste, avait déjà été établi dans notre mémoire précédent, où nous avons montré que cette dose ne représente que le huitième environ de la dose mortelle. Enfin, chez les animaux qui succombent après injection de bacille de Pfeiffer — la mort survient habituellement entre la quinzième et la trentième heure — la généralisation de l'infection par cette bactérie a été régulièrement confirmée par ensemencement du sang du cœur sur gélose au sang.

On peut donc estimer en moyenne à 250, au moins, le coefficient d'augmentation, sous l'action du virus grippal, de la réceptivité au bacille de Pfeiffer ; ce coefficient a parfois atteint 2 000. Cet écart, observé en utilisant des cultures de bacille de Pfeiffer sur milieu solide, est donc considérablement supérieur à celui (4 à 6) que nous avaient indiqué nos essais précédents, comportant l'emploi de cultures en bouillon-sang. Peut-être cette différence est-elle due au fait que les cultures en milieu liquide renferment des produits toxiques dont l'action tend à masquer celle imputable à la virulence du germe. Quoi qu'il en soit, il est

évident que l'emploi de cultures sur milieu solide imite de plus près les conditions de la contamination naturelle ; aussi les observations auxquelles il a donné lieu semblent-elles fournir une reproduction expérimentale particulièrement fidèle de l'influence favorisante que la grippe exerce, chez l'homme, sur l'infection par le bacille de Pfeiffer.

L'écart considérable de sensibilité entre les cobayes témoins et les cobayes grippés nous a permis d'estimer, plus aisément que nous ne pouvions le faire dans les essais antérieurs, l'influence de doses moindres de virus grippal sur la réceptivité au bacille de Pfeiffer.

On injecte 1/200 de culture de bacille de Pfeiffer sur gélose-sang — soit 1/50 de la dose mortelle pour l'animal témoin — dans le péritoine de cobayes ayant reçu, une demi-heure plus tôt, du virus grippal en quantité correspondant respectivement à 1 250, 2 500, 5 000 et 10 000 unités hémagglutinantes, tandis qu'un cobaye ayant reçu 20 000 unités est inoculé de 1/1 000 de culture de bacille de Pfeiffer. L'expérience est réalisée en double, à quelques jours d'intervalle, à l'aide de cultures et d'éluats virulents différents. Tous les cobayes ayant reçu moins de 5 000 unités de virus survivent ; un des deux cobayes inoculés de 10 000 unités succombe (après vingt-deux heures), de même que l'un des deux cobayes qui, inoculés de 20 000 unités de virus, n'ont reçu que 1/1 000 de culture de bacille de Pfeiffer.

La sensibilité au bacille de Pfeiffer diminue donc rapidement lorsqu'on réduit la dose de virus inoculée ; si celle-ci ne dépasse pas 5 000 unités, les cobayes résistent en effet à l'injection de 1/200 de la culture bactérienne. Toutefois, nous avons constaté que, après avoir reçu 5 000 unités de virus, le cobaye succombe à l'injection de 1/50 de culture de bacille de Pfeiffer et manifeste donc encore une sensibilité plus que décuple de celle du témoin. A cet égard, un parallélisme frappant se constate entre le degré de sensibilité à l'infection bactérienne et l'importance des effets toxiques provoqués par le virus et que nous avons décrits dans notre mémoire précédent : la fréquence de la pycnose leucocytaire ne se marque nettement qu'après injection d'une dose de virus correspondant au moins à 5 000 unités, et l'abondance de l'exsudat péritonéal diminue rapidement avec la quantité de virus inoculée ; la sensibilisation au bacille de Pfeiffer n'est donc bien marquée que lorsque les effets toxiques du virus sont bien apparents.

Signalons encore que l'augmentation de la sensibilité à l'infection par le bacille de Pfeiffer s'atteste non seulement lorsque le virus est inoculé peu avant la bactérie, mais aussi s'il l'est une heure, et même cinq heures, après elle : l'action sensibilisante du virus semble donc très rapide, puisqu'elle se dénonce même

lorsque le virus n'est inoculé que plusieurs heures après la bactérie.

★★

L'importance de l'écart qui sépare les doses mortelles de virus grippal et de bacille de Pfeiffer selon que le virus et la bactérie sont utilisés concomitamment ou isolément indique que lorsque l'association de ces deux germes entraîne la mort de l'animal, celle-ci n'est pas due au simple cumul de leurs actions nocives respectives, mais résulte bien d'une sensibilisation de l'organisme, sous l'action toxique du virus, à l'infection par la bactérie. Mais il convient évidemment de rechercher si cette sensibilisation se manifeste spécialement vis-à-vis du bacille de Pfeiffer, ou si elle s'observe aussi à l'égard de germes pathogènes quelconques, ne se comportant pas comme associés au cours de la grippe humaine.

Nous avons eu recours, dans ce but, au colibacille, dont l'inoculation intrapéritonéale au cobaye provoque aisément chez cet animal une septicémie mortelle. Or, en opérant dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus à propos du bacille de Pfeiffer, nous n'avons observé, sous l'action toxique du virus grippal, aucune augmentation de sensibilité à l'infection par le colibacille, dont la dose minima mortelle, pour la souche que nous avons utilisée (*E. coli* VA), se situe aux environs de 1/20 de culture sur gélose. Pour ce qui concerne le vibrion cholérique (souche Inaba) que nous avons également éprouvé à cet égard, la dose minima mortelle pour le cobaye inoculé de virus grippal, soit 1/4 de culture sur gélose, s'est montrée environ égale au quart de celle mortelle (1 culture) pour le cobaye témoin. Mais l'ensemencement du sang du cœur des animaux ayant succombé à l'inoculation du vibrion demeure stérile : la légère différence de sensibilité observée ne peut donc être considérée comme traduisant une influence favorisante du virus sur l'infection cholérique et s'explique vraisemblablement par le cumul, chez l'animal « grippé », des actions toxiques du virus et du vibrion.

Nous avons, d'autre part, étendu nos recherches à deux autres bactéries, fréquemment responsables de complications au cours de la grippe humaine, le pneumocoque et le streptocoque.

Harford, Leidler et Hara [2] ont reconnu que, après inoculation de virus grippal par la voie respiratoire, l'inhalation de pneumocoques provoque chez la souris une infection plus grave qu'en l'absence de virus, pour autant toutefois que l'infection par le virus ait déjà causé des lésions macroscopiquement décelables au moment où les pneumocoques sont introduits.

Bien que, dans la technique que nous utilisons, l'inoculation de la bactérie suive d'une demi-heure seulement celle du virus,

nous avons observé une différence nette de sensibilité, à l'infection pneumococcique, entre cobayes inoculés de virus et cobayes témoins. Pour la souche que nous avons employée, la dose mortelle pour l'animal témoin est de 1 culture entière sur gélose-sang, elle est de 1/10 de culture pour le cobaye préalablement inoculé de virus grippal. L'écart de sensibilité est donc de 1 à 10 ; bien que très appréciable, il est donc très inférieur à celui constaté pour le bacille de Pfeiffer.

Selon Carlisle [3], l'inoculation intranasale, chez la souris, d'une dose inframortelle de virus grippal A diminue la résistance de l'animal à un streptocoque hémolytique du groupe C ultérieurement introduit par la même voie ; c'est du quatrième au douzième jour après l'inoculation virulente que l'augmentation de la sensibilité à ce streptocoque se marque le mieux ; à ce moment, la dose mortelle, selon cet auteur, serait dix fois moindre que chez les souris témoins.

Nous avons utilisé une souche de streptocoque hémolytique récemment isolée d'un exsudat angineux et qui, dans la cavité péritonéale du cobaye, donne des formes fortement encapsulées. Chez le cobaye témoin, la dose minima mortelle est de 1/4 de culture de vingt-quatre heures sur gélose-sang ; la mort survient en dix-huit à vingt-quatre heures et le germe peut être mis en évidence dans le sang du cœur par ensemencement sur gélose au sang. En opérant dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus à propos des germes précédemment étudiés, nous avons constaté que, après inoculation de 20 000 unités de virus grippal, la dose mortelle de ce streptocoque se trouve abaissée à 1/400-1/800 de culture. Le coefficient d'augmentation de la réceptivité, sous l'action toxique du virus grippal, est donc compris entre 100 et 200. En outre, le cobaye « grippé » succombe parfois à l'inoculation de doses beaucoup moindres de ce streptocoque : 1/6 400 de culture dans un cas.

C'est donc à l'égard du bacille de Pfeiffer et du streptocoque hémolytique que la sensibilisation, sous l'action toxique du virus grippal, s'atteste le plus intense ; bien marquée vis-à-vis du pneumocoque, elle est nulle à l'égard du colibacille.

André Govaerts recherche actuellement dans notre laboratoire si d'autres virus possédant certaines propriétés du virus grippal, comme le virus des oreillons et celui de la maladie de Newcastle, partagent également avec lui l'influence favorisante décrite ci-dessus.

★ ★

Nous avons poursuivi, d'autre part, l'étude, à laquelle nous faisons brièvement allusion en terminant notre mémoire précédent, des rapports éventuels unissant, au pouvoir infectieux et au

pouvoir hémagglutinant, les propriétés du virus responsables des effets toxiques que nous avons décrits. Nos essais indiquent que, comme l'ont signalé G. Henle et W. Henle [4], le pouvoir toxique est un peu moins sensible au chauffage que le pouvoir infectieux, mais cette différence de sensibilité est légère et difficile à mettre en évidence, les propriétés toxiques en cause dans nos expériences étant complètement abolies par chauffage de trente minutes à 58°. Par contre, l'indépendance entre ces propriétés et le pouvoir hémagglutinant, un peu plus résistant au chauffage, nous paraît établie par l'expérience que voici :

On chauffe pendant une heure à 58° une portion d'un éluat virulent obtenu en solution physiologique tamponnée et de titre hémagglutinant égal à 1/8 192. Ce chauffage a pour effet de réduire ce titre au quart de sa valeur initiale, soit à 1/2 048. Or l'injection intrapéritonéale de 10 ml de cet éluat ne produit aucun des effets toxiques que nous avons décrits, tandis que ceux-ci se présentent avec leurs caractères habituels après injection d'un volume égal du même éluat utilisé frais, mais préalablement dilué au quart, et dont le titre hémagglutinant est donc égal à celui de l'éluat chauffé.

Divers autres résultats, en outre, concourent à démontrer l'indépendance entre le pouvoir toxique et le pouvoir hémagglutinant. Signalons notamment qu'une suspension virulente privée de ses propriétés enzymatiques par chauffage à 56°, et dont le titre hémagglutinant est 1/2 048, ne perd aucunement son aptitude à déclencher les effets toxiques caractéristiques si, par mélange préalable à un volume égal d'ovomucine (1), son titre a été abaissé à 1/16, tandis que, bien entendu, l'injection d'un même volume de la suspension virulente, amenée au titre 1/16 par dilution, reste sans effet. Signalons aussi que l'injection de 5 ml de filtrat cholérique (2) riche en enzyme RDE, pratiquée une heure avant celle d'un éluat virulent, n'affecte aucunement les effets toxiques de celui-ci.

Nous terminerons par quelques renseignements complémentaires recueillis au cours de ces recherches. Nous avons observé notamment que le virus demeure apte à produire ses effets toxiques lorsqu'on l'inocule adsorbé sur globules rouges, ce qui n'a rien d'étonnant puisque, comme on le sait, le virus adsorbé s'élué à 37°. Fait plus intéressant, ces effets toxiques se constatent également lorsque le virus injecté est adsorbé sur de l'hydrate

(1) L'ovomucine a été préparée selon la méthode de A. Gottschalk et P. Lind (*Brit. J. Exp. Path.*, 1949, **30**, 85).

(2) Filtrat obtenu aux dépens de cultures de la souche Z4N en milieu semi-fluide et titré, au point de vue de sa teneur en enzyme RDE, suivant les techniques employées par E. Nihoul (*C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 1891). Le titre de la préparation utilisée était 1/320.

d'alumine, comme le montre l'expérience suivante. On ajoute, à 5 ml de suspension virulente de titre 1/8 192, 1 ml de suspension d'hydrate d'alumine et laisse le mélange pendant vingt-quatre heures à 4°. Le titre du liquide surnageant séparé ensuite après centrifugation n'est plus que 1/64 : la quasi totalité du virus s'est donc fixée sur le précipité minéral. Or, le culot, repris en 2,5 ml de solution physiologique tamponnée, fait apparaître, après injection intrapéritonéale, un exsudat qui, examiné après quarante heures, se distingue de l'exsudat recueilli chez le témoin ayant reçu la même quantité d'hydrate d'alumine, non seulement par son abondance, mais aussi par l'extrême fréquence des polynucléaires pycnotiques.

Nous avons déjà signalé, dans notre mémoire précédent, que la pycnose des polynucléaires n'est bien perceptible que vingt-quatre heures au moins après l'injection intrapéritonéale du virus. Nous avons recherché depuis si des effets du virus sur les leucocytes ne seraient pas perceptibles plus rapidement si l'on injecte celui-ci dans une cavité péritonéale renfermant déjà un exsudat leucocytaire dont la formation a été provoquée par une injection de bouillon pratiquée six à sept heures plus tôt. La seule modification apparente, à l'examen effectué deux heures et demie après l'inoculation du virus, consiste dans l'agglutination des cellules de l'exsudat, laquelle atteste le fait bien connu que le virus grippal agglutine les globules blancs comme les globules rouges.

RÉSUMÉ.

1° L'emploi de cultures de bacille de Pfeiffer sur milieu solide (gélose-sang) révèle, beaucoup mieux que celui de cultures en milieu liquide (bouillon-sang) ne nous a permis de le faire précédemment, l'influence favorisante des effets toxiques du virus grippal sur l'infection par cette bactérie. Pour la souche que nous avons utilisée, la dose de culture sur gélose-sang qui, injectée par la voie intrapéritonéale, entraîne la mort par septicémie, se situe aux environs de 1/4 de culture chez le cobaye témoin. Par contre, cette dose mortelle oscille, selon les animaux, entre 1/250 et 1/4 000 de culture, chez les cobayes ayant reçu par la même voie, une demi-heure plus tôt, une dose de virus grippal qui, tout en étant très inférieure à la dose mortelle, suffit à provoquer les effets toxiques que nous avons décrits précédemment et qui consistent dans la production d'un exsudat séreux très abondant caractérisé par la grande fréquence des images de pycnose leucocytaire. En moyenne, l'écart entre les doses de bacille de Pfeiffer respectivement mortelles pour le cobaye « grippé » et pour le cobaye témoin est de 1 à 250 au moins.

2° Cet abaissement considérable, sous l'action du virus grippal,

de la dose mortelle de bacille de Pfeiffer, ne peut s'expliquer par le simple cumul des actions nocives respectives du virus et de la bactérie, mais est bien attribuable à une sensibilisation produite par la première à l'égard de la seconde. En effet, dans les mêmes conditions expérimentales, la dose mortelle d'une bactérie qui, comme le colibacille, n'est pas un associé normal du virus grippal, s'est montrée la même chez le cobaye « grippé » et chez le cobaye témoin. Dans les mêmes conditions, le pneumocoque tue le cobaye « grippé » à dose environ dix fois inférieure à la dose qui tue le témoin. Pour un streptocoque hémolytique, l'écart observé a été beaucoup plus considérable, soit compris entre 100 et 200.

Parmi les « associés » normaux du virus grippal, le bacille de Pfeiffer et le streptocoque se montrent donc particulièrement aptes à tirer profit des effets toxiques de ce virus.

3° Les effets toxiques produits par l'inoculation intrapéritonéale de virus grippal au cobaye se montrent indépendants de la propriété hémagglutinante du virus. Le pouvoir toxique est en effet plus sensible au chauffage que le pouvoir hémagglutinant : d'autre part l'action toxique du virus n'est pas affectée par mélange préalable du virus avec de l'ovomucine, laquelle, on le sait, réduit considérablement le pouvoir hémagglutinant. Cette action toxique se manifeste encore si le virus, avant d'être injecté, a été adsorbé sur de l'hydrate d'alumine.

En conclusion, l'influence favorisante — bien connue chez l'homme — qu'exerce la grippe sur certaines infections associées relève d'une action toxique du virus grippal. Elle se manifeste sans délai après injection d'une dose massive de virus au cobaye, non réceptif à l'infection grippale. L'augmentation de sensibilité sous l'action toxique du virus, nulle à l'égard du colibacille, est modérée (dix fois) vis-à-vis du pneumocoque, mais est considérable à l'égard du streptocoque hémolytique (cent à deux cents fois) et surtout vis-à-vis du bacille de Pfeiffer (au moins deux cent cinquante fois).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. BORDET et L. QUERSIN-THIRY. *Ces Annales*, 1951, **81**, 394.
- [2] C. HARFORD, V. LEIDLER et M. HARA. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 53.
- [3] H. N. CARLISLE. *Ohio State Univ. Absts. Doctoral Diss.*, 1947-1948, **56**, 193.
- [4] G. HENLE et W. HENLE. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 623 et 639.

**ESSAIS DE CULTURE
DU VIRUS DE LA MALADIE DE CARRE
SUR MEMBRANES CHORIO-ALLANTOÏDES
ET SUR TISSUS EMBRYONNAIRES DE POULET**

par E. LASFARGUES (*).

(*Institut Pasteur, Annexe de Garches.*)

La culture du virus de la maladie de Carré a fait l'objet de recherches encore peu nombreuses. Mitscherlich [1] fut le premier à montrer qu'il survit encore six jours après son inoculation sur la membrane chorio-allantoïde de l'œuf de poule. En 1939, Plummer [2] réussit les transferts en série et constate que le pouvoir infectant des membranes allantoïdes vis-à-vis du furet est retenu après 6 passages. Le virus semble toutefois avoir complètement disparu au moment du 9^e transfert.

Beveridge et Burnet [3] essaient, de leur côté, chacune des voies possibles d'inoculation à l'œuf et n'enregistrent aucun succès, même lorsque cette inoculation est pratiquée dans l'embryon lui-même. En 1948, Haig [4] signale à nouveau la possibilité de cultiver le virus de Carré sur membrane chorio-allantoïde. Il s'agit du virus modifié de Green, spécialement adapté au furet ; après 30 passages, celui-ci conserve encore son pouvoir léthal puis le perd progressivement jusqu'au 90^e transfert [5]. Cabasso et Cox [6] entretiennent de la même façon un virus prélevé à l'origine sur le chien, mais adapté à la culture sur membrane chorio-allantoïde par 4 passages alternatifs œuf-furet (souche Lederle). Ici encore le pouvoir léthal est retrouvé jusqu'au 26^e transfert. Au cours des passages suivants les extraits chorio-allantoïdiens ne sont plus mortels pour le furet, mais offrent des propriétés vaccinales. Les lésions spécifiques observées sur les membranes chorio-allantoïdes dès les premiers passages persistent jusqu'au 72^e transfert et au delà.

En culture de tissus, les deux seules tentatives de Kantorowicz [7], puis de Mitscherlich [4] aboutissent à un échec. Ce dernier auteur, par la méthode des cultures en goutte pendant

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 janvier 1953.

et en présence de tissus provenant soit de jeunes chiens, soit de cobayes, constate la disparition de l'agent pathogène après quarante heures.

Nous avons adopté ces deux lignes de recherche, conjointement et ce sont nos premiers résultats qui font l'objet de cet exposé.

A. — CULTURES SUR MEMBRANES CHORIO-ALLANTOÏDES.

La méthode d'inoculation sur membrane chorio-allantoïde (Beveridge et Burnet [8]) nous a paru la plus commode. La récolte des membranes C. A. se fait après quatre jours d'incubation à 37° C. Celles-ci sont pesées et broyées au mortier en présence d'un mélange sérum de cheval-solution saline isotonique (1 ml par gramme d'allantoïde). Ce mélange, généralement utilisé pour toute manipulation du virus, est formé par 60 p. 100 de solution de Tyrode et 40 p. 100 de sérum de cheval; il renferme 1 000 unités de pénicilline au millilitre. Le liquide recueilli après cinq minutes de centrifugation à 2 000 tours sert à l'inoculation d'une nouvelle série de cultures.

Les suspensions de virus utilisées au cours de nos expériences sont : un virus du commerce d'origine furet, purifié, lyophilisé (souche n° 1) et un virus préparé à partir du broyat, en mélange Tyrode-sérum, de rates et de cerveaux de furets infectés.

RÉSULTATS. — Les résultats obtenus sont exposés dans les tableaux I et II. La souche n° 1 fut maintenue pendant cinq mois, la souche n° 2 un peu plus de sept mois.

TABLEAU I. — Culture du virus de Carré, souche N° 1 sur membrane chorio-allantoïde.

PASSAGES	LÉSIONS	TEST FURET	TEST CYTOLOGIQUE
1	0		
6	0	Mort 10 j.	
8	Granulations, épais, œdème.		
10	Granulations, œdème.	Mort 10 j.	Inclusions cytopl. fibroblastes poulet.
46	Cartonnage, œdème.		Inclusions.
37	Infection microbienne généralisée.		

Les méthodes de détection du virus dans les cultures sont variables.

Ainsi, les extraits allantoïdiens de la souche n° 1 introduits après le 10^e passage dans des cultures de fibroblastes de poulet provoquent l'apparition d'inclusions cytoplasmiques fortement éosinophiles. Ces inclusions sont étroitement liées à la présence du virus; nous avons montré qu'une neutralisation préalable de celui-ci par un anti-sérum

TABLEAU II. — Culture du virus de Carré, souche N° 2, sur membrane chorio-allantoïde.

PASSAGES	LÉSIONS	TEST FURET	TEST SÉROLOGIQUE
1.	0	Mort 8 j.	Virus présent.
4.	0		
9.	Membr. épais., granulations, œdème.		
12.	Cartonnage, granulations, œdème.	Mort 10 j.	Virus présent. Réaction faible.
34.	<i>Id.</i>		
37.	<i>Id.</i>		
40.	<i>Id.</i>	0	0
45.	<i>Id.</i>	0	0
50.	<i>Id.</i>	0	0

spécifique prévient leur formation [9]. Leur apparition peut donc, à la rigueur, servir de test pour déceler le virus dans un extrait tissulaire ou un milieu de culture.

Un test sérologique, basé sur le phénomène de congutination découvert il y a longtemps déjà par Ehrlich, puis J. Bordet et ses collaborateurs [40], a été mis au point. Il permet de déceler avec fidélité la présence du virus dans les extraits allantoïdians [41]. Dans le cas présent, il fut régulièrement appliqué à la souche n° 2 à partir du 9^e passage. Le virus a, de la sorte, été mis en évidence jusqu'au 37^e passage ; il semble disparaître complètement par la suite.

La recherche *in vivo* des propriétés léthales du virus de culture est faite en injectant, par voie intrapéritonéale, 1 ml d'extrait allantoïdien à des furets. Les extraits de la souche 1 furent mortels dans les délais classiques après les 6^e et 10^e passages. Ceux de la souche 2 le furent encore après le 34^e passage mais ne le furent plus aux 40^e, 45^e et 50^e passages. Les furets ayant reçu ces extraits n'ont pas été protégés contre l'inoculation d'une dose mortelle de virus brut. Il semble donc, comme l'a déjà indiqué le test de congutination, que le virus ait complètement disparu après le 34^e passage.

Un fait doit cependant retenir tout spécialement notre attention sur les deux tentatives que nous venons de faire. Des lésions importantes se développent sur les membranes chorio-allantoïdes à partir du 8^e ou du 9^e passage. Elles sont caractérisées tout d'abord par un épaississement marqué au point d'inoculation, parfois accompagné d'œdème. Un fin sablé autour du foyer central donne à la membrane un aspect granuleux ; cette zone granulaire s'étend le long des vaisseaux traversant la région infectée. Les lésions vont en s'accroissant et donnent souvent à la membrane une consistance cartonnée déjà signalée par les auteurs anglo-américains. Dans certains cas on voit apparaître au point d'inoculation une petite sphère dure, de nature fibreuse, semblable à une perle de petite dimension.

Même quand le virus paraît ne plus se trouver sur les membranes chorio-allantoïdes (38° à 50° passage), les lésions observées continuent à se manifester. Ce fait est étonnant et il intéresse encore plus quand on remarque à l'examen des tableaux I et II que de telles lésions peuvent au contraire être absentes, à un moment où le virus, lui, existe sans nul doute (6° passage S. 1 et 4° passage S. 2). Dans ces conditions, on est obligé de se demander si elles sont dues au virus lui-même ou si elles ne relèvent pas plutôt d'un mécanisme tout à fait particulier. Peut-être s'agit-il d'une auto-sensibilisation des membranes à l'égard de leurs propres extraits, auto-sensibilité rendue possible par la présence, au début, du virus dans les préparations. Il y a certainement là un fait qui mérite d'être signalé ; nous avons l'intention de l'étudier spécialement.

B. — CULTURES SUR TISSUS EMBRYONNAIRES.

L'apparition d'inclusions cytoplasmiques par simple introduction de virus allantoïdien dans des cultures de fibroblastes de poulet (fig. 1 et 2) présente, à notre avis, un intérêt plus grand que celui d'un test cytologique. Ces inclusions semblent en effet indiquer que les tissus embryonnaires de poulet offrent un support favorable à la conservation du virus de la maladie de Carré, peut-être même à sa multiplication.

Pour vérifier cette hypothèse, deux techniques ont été utilisées. L'une par croissance continue sur film de plasma en présence d'une phase liquide, l'autre, suivant le procédé désormais classique de Maitland ou de Rivers en milieu complètement liquide. Phase liquide et milieu sont à base du mélange sérum de cheval-solution saline déjà mentionné. La solution de Earle [12] plus tamponnée remplace la solution de Tyrode. De l'extrait embryonnaire est ajouté dans la proportion de 1/10 dans les cultures sur film de plasma.

Après quatre jours d'incubation à 37° C la phase liquide est remplacée par une nouvelle, sans virus. Les cultures de type Maitland sont recueillies dans un mortier, broyées et centrifugées à vitesse ménagée. Le liquide surnageant sert à infecter une nouvelle série de flacons.

La suspension de virus initiale servant à infecter les cultures au départ, est obtenue à partir du broyat de rate et de cerveau de furet infecté. Elle entre dans la proportion de 1/10 dans la confection du milieu de ces cultures.

RÉSULTATS. — *Les cultures sur film de plasma* ont été réalisées tour à tour en flacons de Carrel, en boîtes de Legroux et en tubes roulants. On constate dans chaque cas une perte rapide du pouvoir infectieux de la phase liquide. Le test de congutination montre que le virus subsiste encore, mais en très faible quantité, après un changement de la phase liquide (huit jours), mais dis-

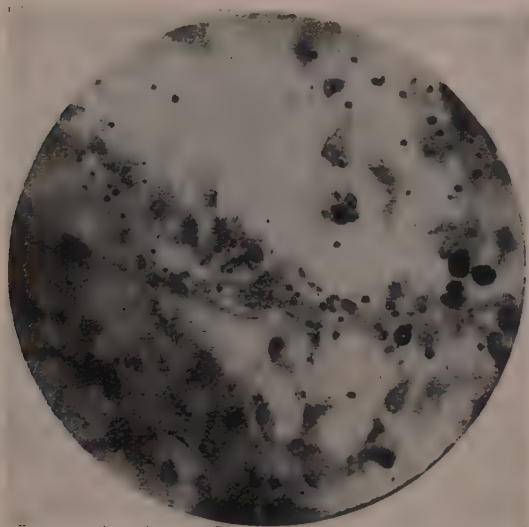


FIG. 1. — Inclusions cellulaires dans une culture de myocarde âgée de 48 heures. Le virus provient d'un extrait allantoidien au 10^e passage. Coloration de Mann. (Gross. : $\times 57$.)

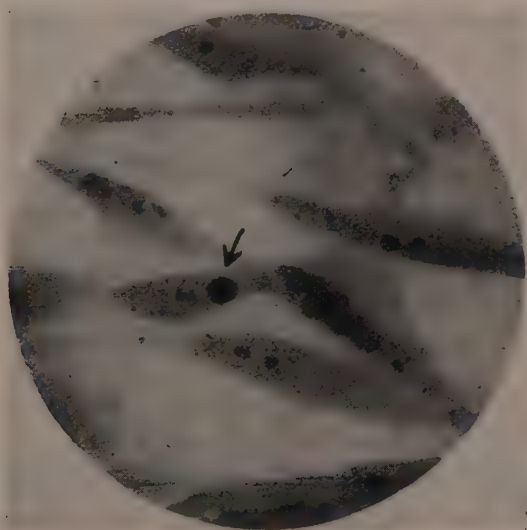


FIG. 2. — Inclusion cytoplasmique géante dans un fibroblaste de poulet. Culture de 48 heures; coloration de Mann. (Gross. : $\times 600$.)

paraît complètement après le second. Si, comme nous l'avons fait dans des boîtes de Legroux, la phase liquide est conservée, on constate, par des prélèvements quotidiens soumis au test de congélation, que le virus persiste au cours des quatre à cinq premiers jours de culture puis s'élimine jusqu'au douzième jour.

L'inoculation expérimentale au furet de la phase liquide après trois changements n'exerce aucun effet pathogène.

Sur film de plasma le virus de Carré survit donc huit jours au maximum. Si l'on considère l'extrême labilité de ce virus qui, en solution, ne résiste que quelques heures à la température du laboratoire et vingt-quatre heures au plus à 4° C, on peut penser que le milieu utilisé n'est pas particulièrement défavorable.

CULTURES EN MILIEU LIQUIDE. — La technique de Maitland ou de Rivers permet, en revanche, l'entretien et la multiplication du virus pendant de longues périodes (tableau III). Après deux mois

TABLEAU III. — Culture du virus de Carré
en milieu liquide, sur tissus embryonnaires de poulet.

PASSAGES (dilution du virus initial)	TEST FURET	CONGLUTINATION	DÉVIATION du complément
1. 10^{-1}	Mort 10 j.	Virus.	
4. 10^{-4}		Virus.	
6. 10^{-6}		Faible réaction.	
8. 10^{-8}		Faible réaction.	
10. 10^{-10}	Maladie 10 j.	Virus.	Actif 1/160.
11. 10^{-11}		Virus.	Actif 1/120.
12. 10^{-12}		Virus.	Actif 1/40.

de culture et 12 passages en série, le test de congélation reste très nettement positif. L'intensité de cette réaction est cependant variable suivant le temps d'incubation des cultures, l'âge des embryons, la température. Ainsi, le maximum de rendement paraît être obtenu après une période d'incubation de quatre jours, à une température uniforme de 37° C et avec une pulpe tissulaire provenant d'embryons âgés de 7 jours.

Des observations analogues ont été faites à partir du 9° passage par la méthode de déviation du complément. La technique utilisée dérive de celle décrite par Kabat et Mayer [13]. Le liquide récolté après le onzième passage servant d'antigène, se révèle actif au 1/120. Cinq jours s'écoulent entre les 11° et 12° passages et la température monte accidentellement jusqu'à 40° C. Cette fois le milieu de culture n'est plus actif qu'au 1/40. Il semble donc qu'une température trop élevée ait sérieusement modifié la multiplication du virus.

Des furets inoculés avec le liquide des cultures au 4^e passage sont morts dix jours après. Au 12^e passage, l'inoculation expérimentale déclenche des symptômes graves, mais non mortels, confirmant ainsi le résultat déjà obtenu par la réaction de déviation du complément.

Des raisons matérielles nous ont empêché de poursuivre ces cultures au-delà du 12^e passage. Nous pensons toutefois avoir obtenu une réelle multiplication du virus. En effet, le virus initial se trouve dilué dix fois à chaque nouveau passage. Après le 12^e sa dilution théorique atteint 10^{-12} ; à cette concentration les tests sérologiques restent positifs et l'inoculation au furet provoque l'apparition des premiers signes de la maladie. Or, si nous diluons extemporanément le virus brut initial dans des volumes croissant de 10 en 10, nous constatons que celui-ci perd toute activité sérologique et pathogène à 10^{-4} . La probabilité d'un simple transport passif du virus dans notre série de cultures est donc relativement faible.

CONCLUSIONS.

Le virus de la maladie de Carré, entretenu sur membranes chorio-allantoïdes, a pu être maintenu pendant 34 passages. Au cours de ces transferts, l'observation suivie des lésions qui se développent sur les membranes C. A. nous a montré un fait curieux. Ces lésions, caractérisées par des granulations, un œdème abondant et souvent un cartonnage ou une réaction fibreuse importante, n'existent pas avant le 8^e passage alors que le virus est effectivement présent ; on les trouve, au contraire, après le 34^e passage, bien que le virus ait à ce moment pratiquement disparu des cultures. Elles ne semblent donc pas dues au virus lui-même, mais à un mécanisme particulier qui fait l'objet de nouvelles recherches en cours.

La culture des tissus embryonnaires de poulet sur film de plasma est défavorable à la multiplication du virus de Carré. Les techniques de Maitland ou de Rivers permettent en revanche l'entretien de cet agent pendant de longues périodes. Une souche de ce virus a pu ainsi être cultivée pendant six semaines, soit 12 passages. A ce moment, l'activité pathogène des cultures était encore très marquée (1).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. MITSCHERLICH. *Deutsch. Tierartzl. Wochenschr.*, 1938, **46**, 497.
- [2] P. J. PLUMMER. *Canad. J. Comp. Med.*, 1939, **3**, 96.

(1) Nous désirons exprimer nos remerciements au D^r R. Corvazier qui a bien voulu faire les tests de congélation, ainsi qu'au D^r M. Raynaud, dans le laboratoire duquel les réactions de fixation ont été réalisées.

- [3] W. I. B. BEVERIDGE et F. M. BURNET. *Med. Res. Council Sp. Report*, Series n° 256, 1946, 76.
- [4] D. A. HAIG. *Onderstepoort J. Vet. Med.*, 1948, **23**, 149.
- [5] D. A. HAIG. *J. South Afr. Vet. Med. Ass.*, 1948, **19**, 73.
- [6] V. CABASSO et H. R. COX. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **71**, 246.
- [7] KANTOROWICZ. *XI^e Congr. Int. Med. Vet.*, Londres, 1930, **1**, 342.
- [8] W. I. B. BEVERIDGE et F. M. BURNET. *La culture des virus et des rickettsies dans l'embryon de poulet*. Paris, Editions Flammarion, 1950.
- [9] E. LASFARGUES et J. LASFARGUES. *C. R. Soc. Biol.*, 1952 (sous presse).
- [10] J. BORDET et F. P. GAY. *Ces Annales*, 1906, **20**, 467.
- [11] R. CORVAZIER et E. LASFARGUES. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 676.
- [12] W. R. EARLE. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1943, **4**, 165.
- [13] E. A. KABAT et M. M. MAYER. *Exp. Immunochemistry*, 1948, **1**, 106.

LE COLLAGÈNE A MÉRITE-T-IL LE NOM DE COLLAGÈNE ET PEUT-IL SERVIR A LA DÉTECTION ET AU TITRAGE DE COLLAGÉNASES BACTÉRIENNES ?

par A. DELAUNAY, M. GUILLAUMIE, G. READE
et J. DI FINE-LASFARGUES (*).

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

Les collagénases sont, par définition, des enzymes capables de détruire le collagène, c'est-à-dire la matière constituante de fibres particulières que l'on trouve dans les tissus conjonctifs.

En 1949, deux d'entre nous (Maylis Guillaumie et Albert Delaunay), en collaboration avec Marcelle Delaunay, ont proposé [1], pour la détection et le titrage de ces enzymes, une méthode nouvelle dans laquelle on utilise, comme substrat, le collagène purifié selon les indications de J. Nageotte (1930) et que cet auteur a appelé collagène A [2].

Quels sont les avantages de cette méthode ? Au moins les suivants, disions-nous dès notre première communication. Il s'agit d'une méthode *fidèle* : étant donné qu'on met en œuvre un collagène très pur, la rapidité et l'intensité de la destruction des « pastilles » utilisées sont seulement fonction de la richesse du milieu en enzyme. Cette méthode, par ailleurs, donne des *résultats très commodes à lire*, compte tenu de la régularité et du faible volume des pastilles. Enfin, elle n'offre dans son emploi *aucune difficulté*, la préparation du collagène A ne réclamant qu'un léger entraînement.

Ces grands avantages n'allaient pas tarder à être reconnus. Dès 1949, en effet, c'est-à-dire quelques mois à peine après la parution de nos premiers travaux, les auteurs anglais spécialisés dans l'étude des collagénases abandonnent les méthodes de détection dont ils s'étaient servi jusqu'alors (muscle frais de cobaye, technique à l'azocoll, etc.), et C. L. Oakley écrit dans les *Annales de l'Institut Pasteur* : « Le papier de collagène est l'indicateur le plus spécifique (pour démontrer l'existence d'une collagénase), surtout quand il est préparé selon la méthode de Delaunay et Guillaumie. L'azocoll est attaqué sans difficulté par les enzymes qui n'attaquent pas le collagène. Si l'on emploie l'azocoll comme indicateur, les épreuves négatives sont la preuve de l'absence

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 décembre 1952.

des collagénases ; les résultats positifs ne peuvent être obtenus qu'avec des indicateurs plus spécifiques » [3].

La méthode au collagène A, ainsi recommandée, devient bientôt la méthode de choix pour l'étude des collagénases. Elle est adoptée peu à peu par tous les auteurs, dans différents pays.

Le problème était-il donc réglé ? En 1950, on eut pu le croire. Pourtant, en 1951, deux auteurs bordelais, J. Brisou et J. Milhade [4] et, en 1952, J. Brisou [5] se croient autorisés à mettre en doute la valeur de la technique que nous avons mise au point. Effectivement, quelles critiques mérite-t-elle ? Les voici :

1° Selon J. Brisou, la préparation du collagène A serait « longue et délicate » et, au demeurant, il s'agirait d'une « matière première assez exceptionnelle », attendu qu'on ne la trouverait que dans les tendons de queue de rats ou des pattes postérieures de certains animaux jeunes. Or, on sait que les histologistes et les chimistes admettent une répartition beaucoup plus vaste du collagène dans la série animale.

2° *Données histologiques.* — D'après J. Brisou, le microscope à contraste de phase montre, pour le *collagène natif* (celui qui serait normalement présent dans les tissus), une structure fibrillaire caractéristique avec, çà et là, quelques vestiges nucléaires. Les fibrilles observées prennent toutes soit l'hématoxyline phosphomolybdique au dioxane de Thomas qui les teinte en violet, soit le rouge vif du picro-ponceau. Avec le collagène A, les observations montreraient au contraire des formations pseudofibrillaires fragiles, de longues chaînettes de corpuscules arrondis. En outre, l'hématoxyline au dioxane ne colore pas les préparations ou, tout au moins, elle les imprègne mal.

3° *Données physiques et chimiques.* — A s'en tenir aux données classiques, le *collagène natif* (ou *naturel*) est rigoureusement insoluble dans l'eau froide, les acides et les alcalis dilués. Mais il est soluble dans l'eau entre 60° et 65° et il se transforme alors en gélatine. Par ailleurs, il donne les réactions suivantes : réaction au biuret, + ; réaction à la ninhydrine, ++ ; réaction xanthoprotéique, ++. Enfin, par dosage, on peut démontrer qu'il contient d'importantes quantités d'azote, donc de protéines. En fait, le collagène naturel, qui appartiendrait au groupe des scléroprotéines, mériterait d'être considéré comme un haut polymère d'acides aminés.

Considérons maintenant le *collagène A*. A l'inverse du précédent, il est soluble dans l'eau légèrement acétifiée. En outre, et cela d'après Brisou, il donnerait les réactions suivantes : biuret, nul ; ninhydrine, très faible ; réaction xanthoprotéique, très faible.

Dosages d'azote. — Ici, les observations rapportées par J. Brisou diffèrent du premier au second mémoire. *Premier mémoire* : taux d'azote impossible à déterminer dans le colla-

gène A (3 essais infructueux). *Second mémoire* : au cours de celui-ci et dans un renvoi de bas de page, on peut lire les mots suivants : « une analyse récente exécutée par M. Morand sur de nouveaux échantillons donne un taux d'N de 15,2, ce qui correspond à 95,76 p. 100 de protéines.

4° *Données biologiques*. — L'action des filtrats bactériens ne serait pas la même, lorsqu'on utilise pour substrat, soit le collagène A, soit le collagène natif (ou naturel). Pour Brisou, seuls les filtrats de culture de *Cl. histolyticum* seraient en mesure d'attaquer le collagène naturel. *Welchia perfringens* et certaines clostridies sécrèteraient « peut-être des collagénases A mais pas de collagénases natives (si ces nouvelles appellations sont autorisées) ».

Que pouvons-nous objecter à ces remarques et à ces critiques ? Notre réponse sera facile.

1. — *Le mode d'obtention* et de préparation du collagène A, tel qu'il a été indiqué par Nageotte, est-il *délicat* ? En vérité, nous ne le pensons pas et les auteurs anglais partagent notre opinion. *Rareté du collagène A* ? Rappelons que Leplat (1933) a montré qu'on pouvait aussi mettre en évidence ce collagène dans les tendons de la queue du chien, dans la peau de différents animaux (cobaye, rat) et dans les cornées du chat [6].

2. — *Données histologiques*. — Personnellement, nous n'avons jamais remarqué, comme Brisou et Milhade, que le collagène A, observé au microscope, se présentait sous la forme de pseudo-fibrilles fragiles. Bien au contraire, nos observations ont ici toujours concordé parfaitement avec celles de Nageotte et cet auteur a écrit : « le collagène A est très voisin du collagène naturel des tissus ; comme lui, il est formé de fibrilles souples et non cassantes, d'épaisseur variable, qui s'éclairent vivement à l'ultramicroscope, se fixent et se colorent par les méthodes électives. Ces fibrilles s'imprègnent d'argent en noir opaque, comme celles de la réticuline, elles sont simples et disposées en feutrages ou bien ramifiées et anastomosées en réseaux à mailles serrées ; en lumière polarisée, elles se comportent comme celles du collagène naturel... »

En accord parfait avec ces simples observations histologiques, apparaissent les données fournies par des examens plus précis. Ainsi, en 1936, Wyckoff et Corey ont montré que l'aspect aux rayons X du collagène obtenu en ajoutant un sel neutre à une solution acétique de collagène (on pourrait aussi bien dire du collagène A) est analogue à celui du tendon originel. En 1950, G. Bahr, étudiant au microscope électronique des fibrilles de collagène A, a remarqué qu'elles offraient les striations caractéristiques du collagène naturel [7]. Récemment (1951), P. Vanamee et Porter ont observé des faits analogues [8]. Tout cela nous

paraît déjà assez significatif. Brisou, certes, qui n'ignore pas le travail de Vanamee et Porter, se déclare prêt à admettre que les tendons soumis à la macération en milieu acide sont capables de libérer une infime partie de substance et que celle-ci, sous l'action d'un réajustement de pH ou par addition de sels neutres, peut reconstituer des fibrilles qui, peu à peu, reprennent l'aspect du collagène natif. Cependant, il se hâte de rappeler que les auteurs américains ont noté des différences « mineures » et il ajoute : « on ne fait pas passer impunément un haut polymère en solution et, une fois reconstruit, il est certainement différent du produit natif ». C'est là une opinion, Brisou regrette enfin que le travail de Vanamee et Porter ne comporte aucune analyse chimique... Etudions donc à présent les données d'ordre chimique.

3. — *Données chimiques.* — Que sait-on aujourd'hui de la constitution du collagène A ? Beaucoup de choses, chacune d'ailleurs plaidant en faveur d'une très étroite parenté entre le collagène A de Nageotte et le collagène dit naturel.

P. Vanamee et K. P. Porter, eux-mêmes, avaient montré en 1951 que la trypsine à 38° et à pH 7,8 n'attaque pas le collagène des tendons frais de queue de rat. Nous pouvons ajouter aujourd'hui qu'il en est de même pour le collagène A extrait de ces tendons, une expérience personnelle nous ayant appris que nos pastilles desséchées restent indéfiniment intactes à 37° dans une solution de trypsine dont la forte activité protéolytique a été au préalable vérifiée.

Dosages d'azote. — Nous nous rappelons que, dans leur mémoire initial, J. Brisou et J. Milhade avaient rapporté ici un échec total : « Collagène A : taux d'azote impossible à déterminer ; 3 essais infructueux. » Emus par cette observation, nous avons aussitôt recherché la teneur en protéines de nos propres préparations. Résultats : de 91 à 93 p. 100. Quelle explication pouvait-on donner à des résultats si discordants ? Déjà, nous avons émis des hypothèses d'après lesquelles les analyses des auteurs bordelais avaient été faites sur des quantités insuffisantes de matériel ou sur un matériel dans un état de polymérisation singulier. Le renvoi de bas de page, lu dans le second mémoire, est venu heureusement nous rassurer.

Jusqu'à présent, nous n'avons pas encore eu l'occasion d'identifier la nature et la quantité des acides aminés présents dans le collagène A, tel qu'on peut l'extraire des tendons de la queue du rat, mais le Dr Jayle a pu doser déjà dans ce matériel le sucre protéique. Voici le résultat qu'il a obtenu, exprimé en milligrammes de glucose : 0,51 mg. Comme la préparation étudiée par le Dr Jayle renfermait par ailleurs 41,6 mg de protéines, cela donne un pourcentage de $\frac{0,51}{41,6} \times 100 = 1,24$ p. 100,

soit une teneur faible en sucre protéique, mais cependant non négligeable.

Autre fait. On sait qu'un des caractères les plus typiques du collagène naturel est sa transformation en gélatine sous l'effet de la chaleur humide. Nous avons pu nous assurer personnellement qu'il en est exactement de même pour le collagène A. En effet, ce dernier se transforme rapidement en gélatine dans l'eau distillée maintenue à 50° et même à 42°.

On admet dans la règle que le collagène naturel est insoluble dans les acides dilués. Au contraire, le collagène A est soluble dans ces liquides. La différence existe, c'est indiscutable, et Brisou a certainement raison d'y insister, mais a-t-elle toute l'importance que tient à lui reconnaître cet auteur ? Ce n'est pas sûr... Nageotte, qui avait été le premier à être frappé par elle, l'a toujours considérée comme secondaire. Ajoutons cet argument personnel. Pour précipiter le collagène A dans les solutions acides, on peut recourir à divers procédés : addition de sels, modification du pH, dialyse contre l'eau courante, etc. Mais, selon l'origine du collagène étudié, tous ces procédés ne donnent pas des résultats comparables. Ainsi, pour un collagène donné, la fibrillogénèse sera provoquée beaucoup mieux par le relargage que par un changement du pH, alors que le contraire sera vrai pour un autre collagène. Compte tenu de ces différences, faut-il dire qu'il y a, non pas un collagène A, mais des collagènes A ? En apparence, rien ne s'opposerait à cela. Pourtant, jusqu'à présent, personne n'a songé à le faire.

4. — *Données biologiques.* — Rappelons cette fois que, d'après Brisou, seuls les filtrats de culture de *Cl. histolyticum* seraient en mesure d'attaquer le collagène natif, les filtrats de *perfringens* ne parvenant à détruire que le collagène A.

Ici, nous pouvons remarquer que, pour affirmer ces faits, Brisou a fait usage d'un collagène qui n'était pas « natif », mais qui avait déjà subi une longue préparation, en particulier qui avait été soumis à une digestion pepsique. Un tel substrat n'était-il pas déjà partiellement dénaturé ? On pourrait le penser, étant donné que l'on sait fort bien que la pepsine est capable d'attaquer jusqu'à un certain point (comme la papaine, selon Brisou) le collagène.

A ce sujet, nous voudrions rapporter une expérience personnelle inédite. Aussitôt après leur prélèvement dans une maternité, nous avons desséché en feuilles très minces des membranes chorio-allantoïdes soigneusement lavées à l'eau courante, puis à l'eau distillée. Dans ces membranes, nous avons découpé de petites rondelles analogues à nos pastilles de collagène A puis, après les avoir stérilisées par séjour dans l'éther, nous les avons ajoutées à des filtrats frais de *Cl. perfringens* type A et de

Cl. histolyticum qui attaquaient parfaitement et rapidement le collagène A. *Résultats* observés au bout d'une semaine de contact à 37° : les rondelles ont subi une légère attaque dans les filtrats *perfringens* A et une désagrégation un peu plus marquée dans les filtrats de *Cl. histolyticum*. Que conclure ? Nous pensons simplement que la texture en fibres de collagène très serrées du matériel en cause s'est opposée à la destruction rapide de celui-ci. Que le filtrat histolytique ait été, par ailleurs, proportionnellement plus actif, cela, en soi, ne nous paraît pas étonnant.

A vrai dire, ce que nous retenons surtout d'une expérience de ce genre, c'est ceci : pour étudier l'action des collagenases, il faut se servir, non pas directement d'un tissu riche en collagène (les résultats étant, en ce cas, trop difficiles à lire), mais d'un collagène isolé d'une trame conjonctive. Isolé, mais non dénaturé. A cet égard, peut-il exister une méthode d'obtention plus simple que celle de Nageotte ? Nous ne le pensons pas, et, sur ce point, les auteurs américains partagent bien notre avis puisque toutes leurs recherches récentes ont été faites précisément avec du collagène A.

Au mois de juillet dernier, au dernier Congrès international de Biochimie tenu à Paris, un auteur russe, Y. N. Orekhovitch, a présenté un travail d'ensemble sur les procollagènes et, à cette occasion, il a prétendu que le collagène A devait être considéré, lui aussi, comme un procollagène, c'est-à-dire un précurseur biologique du collagène vrai [9].

D'après Orekhovitch, les procollagènes seraient en quantité variable non seulement chez les différentes espèces animales, mais aussi, pour une même espèce, selon le tissu examiné et l'état physiologique du sujet sur lequel on opère. Ils se distingueraient essentiellement du collagène vrai :

Par une certaine différence de constitution chimique ;

Par une sensibilité très vive à l'action des enzymes. Ainsi, pour Orekhovitch, le procollagène de la peau serait hydrolysé par toutes les protéinases tissulaires et digestives actuellement connues.

Que des précurseurs du collagène existent effectivement et qu'ils méritent une appellation spéciale : procollagènes ou pré-collagènes, nous sommes prêts à l'admettre très volontiers. Mais les caractères des procollagènes donnés par Orekhovitch suffisent-ils à faire distinguer ces substances du collagène vrai ? Sur ce point, on peut discuter.

Envisageons, en premier lieu la *différence de constitution chimique*. Pour plus de clarté, reproduisons ici les chiffres donnés par l'auteur russe (V. Tableau).

Effectivement, à la lecture de ce tableau, on remarque des différences dans les teneurs en phénylalanine, en histidine, en proline

**Taux des acides aminés dans le procollagène et le collagène
(d'après N. Orekhovitch).**

	PROCOLLAGÈNE de la peau		COLLAGÈNE (d'après Boves et KENTEN)	GÉLATINE de la peau de veau
	Rat	Bœuf		
Tryptophane	0,0	0,0	0,0	0,5
Tyrosine	0,0	0,0	1,4	0,44
Phénylalanine	2,4	2,3	4,2	2,2
Cystine et cystéine	0,0	0,0	0,0	0,07
Méthionine	0,62	0,66	0,8	0,61
Arginine	8,8	9,2	8,8	8,0
Lysine	4,6	4,6	4,5	4,1
Histidine	2,5	2,9	0,8	0,79
Citrulline	0,2	0,2		
Acide aspartique	5,3	5,2	6,3	6,7
Acide glutamique	11,4	11,0	11,3	11,5
Proline et oxyproline	20	20	29,1	34,1
Glycocolle	26,0	28,0	26,2	25,5
Alanine	8,5	9,5	9,5	8,7

et oxyproline. Mais s'agit-il de différences considérables ? Non. Comme le mentionne Y. N. Orekhovitch lui-même, un tel tableau indique que les molécules de procollagène sont construites sur le même type que les molécules de collagène (+ de 25 p. 100 de glycocolle, fort pourcentage de proline et d'oxyproline). D'autre part, les deux espèces de protéines contiennent, l'une et l'autre, très peu d'acides aromatiques et thioacides.

Que des taux un peu différents soient obtenus pour tel ou tel acide aminé pris en particulier, en vérité, quelle importance ? On sait fort bien que, selon l'origine du collagène examiné chimiquement, on observe toujours des différences de cet ordre. Reportons-nous aux chiffres donnés par Kanagy, par Bowes et Kenten, par Graham, Waitkoff et Hier (ils sont précisément reproduits dans la thèse de Milhade, inspirée par Brisou). Nous verrons alors que si, de collagène à collagène (on ne parle pas en ce cas de procollagène), on retrouve toujours un fort pourcentage de glycocolle, on observe au contraire des résultats souvent très variables pour les autres amino-acides.

Ces résultats, au demeurant, nous paraissent d'autant moins surprenants que nous avons personnellement tendance à croire que la molécule de collagène doit être à même de subir, sous l'influence de facteurs nombreux, de perpétuels remaniements.

Orekhovitch dit par ailleurs : le collagène A n'est qu'un procollagène. Assurément, comme nous venons de le montrer, il ne peut pas affirmer ce fait en se fondant sur une constitution chimique particulière. Est-ce en raison de la solubilité de ce

corps en milieu acide, de sa facile transformation en gélatine. d'après sa sensibilité enfin aux enzymes ? L'auteur russe remarque ici : le collagène natif n'est pas digéré par la trypsine tandis qu'il est attaqué assez bien par la pepsine ; au contraire, le procollagène de la peau serait hydrolysé par toutes les protéinases tissulaires et digestives actuellement connues. Si cela est vrai, le collagène A, du moins tel qu'on peut l'extraire des tendons de queue de rat, n'est certainement pas identique à ce procollagène, attendu que les expériences de Vanamee et Porter, comme les nôtres, ont montré que le premier restait intact, à 37-38°, dans les solutions de trypsine mises en œuvre.

Le travail de Orekhovitch ne nous paraît donc pas démontrer à lui seul qu'il existe des procollagènes et que le collagène A est l'un d'entre eux. Répétons toutefois que nous ne mettons pas en doute l'existence éventuelle de pro- ou de précollagènes. Les auteurs américains, d'ailleurs, pensent sur ce point un peu comme nous. Mais, à leur avis, collagène et procollagènes se différencieraient surtout par la structure physique, les fibrilles de collagène natif ayant une périodicité axiale de 650 A., alors que cette périodicité, pour les procollagènes, serait plutôt de l'ordre de 2 100 A. (J. H. Highberger, J. Gross et F. O. Schmitt [40]).

Quelle périodicité a-t-on trouvé dans les fibrilles de collagène A reconstituées par addition de sels à des solutions acides de collagène ? 650 A. A cet égard, nous avons déjà cité les observations de G. Bahr, de P. Vanamee et de Porter. Nous pourrions encore ajouter celles de F. O. Schmitt, C. E. Hall et M. A. Jakus [41], de J. H. Highberger, J. Gross et F. O. Schmitt [42], etc.

Nous voici arrivés aux conclusions. En fait, compte tenu des réserves qu'a cru devoir formuler Brisou, nous nous trouvons placés devant deux questions :

Le collagène A de Nageotte mérite-t-il effectivement le nom de collagène ?

Peut-il servir pour des recherches sur les collagénases ?

I. — LE COLLAGÈNE A MÉRITE-T-IL LE NOM DE COLLAGÈNE ?

Nous pensons avoir le droit de répondre : oui, et cela parce que le premier possède en commun avec ce qu'on appelle le collagène vrai (ou naturel, ou natif...) les propriétés suivantes :

1° Le collagène A dans l'eau, comme le collagène vrai, donne par hydrolyse à chaud de la gélatine. (Or, que signifie étymologiquement le mot collagène, sinon substance capable de donner de la gélatine ?)

2° Le collagène A, sous forme précipitée, prend l'aspect de fibrilles en tous points comparables aux fibrilles de collagène

qu'on observe sur coupes ou par dilacération de tissus conjonctifs.

3° Le collagène vrai est très riche en azote. Aussi le considère-t-on comme étant de nature protéique. Mêmes remarques pour le collagène A qui peut contenir, comme nous l'avons indiqué, un taux de protéines de l'ordre de 93,3 p. 100.

4° Le collagène dit vrai est très difficile à purifier parce que, en dépit des plus grands efforts, on ne parvient pas, le plus souvent, à débarrasser la protéine qui le constitue de souillures glucidiques. Même remarque pour le collagène A extrait des tendons de queue de rat (voir ci-dessus nos observations personnelles). Un fait identique a d'ailleurs été noté par les auteurs américains, ceux-ci ayant observé, dans des solutions acides de collagène obtenu à partir de tissus différents, la présence quasi constante de matières hydrocarbonées.

5° Trouve-t-on les mêmes acides aminés dans le collagène dit vrai et le collagène A ? Oui, si l'on tient compte des chiffres donnés par Orekhovitch (puisque, pour cet auteur, collagène A et procollagène seraient des substances de même type). On trouve non seulement les mêmes acides aminés, mais on les trouve dans des proportions fort comparables.

Tant d'arguments n'autorisent-ils pas à conserver au collagène A son nom de collagène ? A notre avis, d'autant mieux que rien, nous l'avons montré, ne justifie l'appellation nouvelle de procollagène. Que valent en effet les raisons qui plaideraient, en apparence, en faveur de celle-ci ?

1° Les diagrammes aux rayons X, les recherches effectuées à l'aide du microscope électronique indiquent pour le collagène dit vrai et le collagène A des différences. Oui, mais de l'avis même des auteurs qui les ont signalées, il s'agit de différences « mineures ».

2° Le collagène A est soluble dans l'eau acétifiée ; le collagène dit vrai ne l'est pas. C'est exact. Mais pourquoi attacher à cette particularité une grande importance ? Faut-il être plus exigeant que Nageotte et que tous les auteurs américains contemporains ? A propos du collagène soluble, dans toutes leurs communications, ceux-ci, en effet, ne précisent même pas collagène A ; ils écrivent simplement collagène.

3° Nous avons, le moment venu, dit pour quelles raisons l'appellation procollagène ne se justifiait pas à propos du collagène A. Nous ne pensons donc pas nécessaire de revenir sur ce point. Rappelons seulement ici que le collagène A a une périodicité axiale de 650 Å., qui est celle du collagène dit vrai, alors que, selon J. H. Highberger et ses collaborateurs, la périodicité des corps que l'on pourrait considérer comme des procollagènes est plutôt de l'ordre de 2 100 Å.

Que, dans les solutions de collagène A, se trouvent aussi —

à côté de faibles quantités de glucides — des traces d'un procollagène, soit. Il n'en reste pas moins vrai que le collagène A mérite d'être considéré comme étant d'abord du collagène.

Un mot encore en achevant cette première réponse. Pour rappeler simplement que le collagène peut exister certainement sous des états de polymérisation divers. On sait combien, à cet égard, ont été éloquentes les recherches qui ont été faites récemment à propos des modifications de structure du tissu conjonctif que peuvent déterminer des carences nutritionnelles ou des déséquilibres d'hormones.

Peut-être que la solubilité ou la non-solubilité du collagène en milieu acide tient simplement à des degrés divers de polymérisation. En tout cas, nous serions personnellement tentés de le croire.

II. — PEUT-ON CONTINUER A UTILISER LE COLLAGÈNE A POUR DES RECHERCHES SUR LES COLLAGÉNASES ?

Indiscutablement oui.

Etant donné l'opinion que nous avons formulée ci-dessus sur le collagène A considéré comme un procollagène, il est à peine besoin d'ajouter que, dans l'état actuel de nos connaissances, il ne nous paraît pas souhaitable d'adopter le terme : *procollagénases*. Des procollagénases existent peut-être (sans doute même), mais rien encore ne permet d'affirmer qu'il y a c'est par l'emploi du collagène A, obtenu selon les indications de Nageotte, que l'on peut démontrer leur existence.

Ceci dit, pour quelles raisons conserve-t-on le droit d'utiliser le collagène A pour des recherches sur les collagénases ? Ces raisons sont nombreuses :

1° Parce que — rappelons-le une dernière fois — le collagène A est effectivement du collagène, tant du point de vue physique que du point de vue chimique.

2° Parce que, à l'heure actuelle, nous ne connaissons pas de méthode permettant d'obtenir, mieux que celle de Nageotte (1), du collagène purifié. Les préparations pepsiques proposées récemment sont certainement plus critiquables. Puisque, pour la recherche et le dosage de l'enzyme spécifique, il faut un substrat, retenons celui qui a été le moins altéré par les manipulations.

(1) Peut-être est-il juste de rappeler ici que Nageotte n'a pas été le premier à remarquer que les tendons de queue de rat peuvent se solubiliser en partie dans l'eau acétifiée. Dès 1900, ce phénomène avait été constaté par Zachariades. Il n'en reste pas moins vrai que c'est à Nageotte (et à sa collaboratrice, M^{lle} Guyon) que revient le mérite d'avoir montré tout l'intérêt qui s'attache à l'étude du collagène A.

3° La méthode de détection et de titrage des collagénases par l'emploi du collagène A possède, disions-nous dès notre première communication, trois grands avantages. Elle est fidèle, elle donne des résultats commodes à lire, elle n'offre aucune difficulté. Qui, l'ayant utilisée après nous, pourrait sincèrement contester ces avantages ?

4° Enfin, nous estimons qu'il existe encore une autre raison pour conserver sa place au collagène A.

Considérons les grands progrès qui ont été faits, au cours de ces dernières années, dans notre connaissance du collagène. Si nous savons aujourd'hui quelle est la structure physique de cette substance dans son intimité, n'est-ce pas en grande partie parce qu'on a utilisé du collagène A ?

Penchons-nous sur les travaux si remarquables qu'effectuent en ce moment J. Gross, J. H. Highberger et F. O. Schmitt d'une part, Th. G. Morrione de l'autre. Grâce à eux, nous commençons peut-être à distinguer le mécanisme de la fibrillogénèse du collagène et, par extension, le mode de production des scléroses tissulaires, problème capital entre tous. Eussent-ils été possibles si les auteurs en question avaient fait usage d'un autre matériel ? C'est peu probable...

Du même coup, nous sommes obligés de reconnaître toute l'importance biologique du collagène A.

Au moment où celle-ci se fait chaque jour mieux sentir, ce serait manifestement une faute que de négliger ce collagène pour la recherche et l'étude des collagénases.

Ce texte était écrit quand nous avons eu connaissance d'une communication de J. Brisou faite devant la Société de Microbiologie le 6 novembre 1952 et intitulée : « Collagénases et procollagénases ».

Cet auteur, se fondant sur la thèse d'Orekhovitch et faisant ainsi du collagène A un procollagène, propose que l'on distingue à l'avenir des collagénases et des procollagénases.

Nous avons dit ci-dessus ce que nous pensons des procollagénases. Il nous paraît donc inutile de revenir ici sur ce point. Peut-être que des procollagénases existent effectivement mais, dans l'état actuel de nos connaissances, nous estimons que ce n'est pas grâce au collagène A, tel que nous avons proposé de l'utiliser, que l'existence de ces nouveaux enzymes peut être nettement démontrée.

Le collagène A, dit Brisou, est un peu moins complexe, moins polymérisé que le collagène définitif. C'est possible, probable même..., mais cela aussi n'est pas certain.

Nous ne dirons rien des expériences nouvelles rapportées par cet auteur car, de toute évidence, elles ne sont pas en mesure de trancher le débat. Ce qui nous frappe surtout, c'est qu'à leur

sujet. Brisou montre qu'il est important, pour la recherche et le titrage des collagénases, d'utiliser un collagène « non traité par les réactifs chimiques ». En ce cas, comment pourrait-on choisir mieux que le collagène A ?

RÉSUMÉ.

Les auteurs ont répondu point par point aux critiques qui cherchaient à mettre en doute la valeur du collagène A comme substrat à utiliser lors de recherches sur les collagénases.

À l'heure actuelle, aucun argument valable ne permet d'affirmer que le collagène A n'est qu'un procollagène.

La valeur de cette substance, comme indicateur d'une réaction enzymatique spécifique, reste donc entière.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] M. GUILLAUMIE et A. DELAUNAY. *Ces Annales*, 1949, **76**, 16.
- [2] J. NAGEOTTE. *Arch. Biol.*, 1930, **41**, 1.
- [3] C. L. OAKLEY. *Ces Annales*, 1949, **77**, 380.
- [4] J. BRISOU et J. MILHADE. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1951, **33**, 64. — J. MILHADE : Contribution à l'étude des collagénases bactériennes. Thèse Doct. en Méd., Bordeaux, 1951.
- [5] J. BRISOU. *Biol. Med.*, 1952, **41**, 264.
- [6] LEPLAT. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 1256.
- [7] G. BAHR. *Exp. Cell. Research*, 1950, **1**, 603.
- [8] P. VANAMEE et PORTER. *J. exp. Med.*, 1951, **94**, 255.
- [9] Y. N. OREKHOVITCH. Communication au II^e Congrès International de Biochimie. Paris, juillet 1952. Volume du Congrès.
- [10] J. H. HIGHBERGER, J. GROSS et F. O. SCHMITT. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1951, **37**, 286.
- [11] F. O. SCHMITT, C. E. HALL et M. A. JAKUS. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1942, **20**, 11.
- [12] J. H. HIGHBERGER, J. GROSS et F. O. SCHMITT. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1952, **80**, 462.

ETUDES SUR LES FORMES RUGUEUSES DES *SALMONELLA*

par M^{mes} S. BÉGUIN et J. GRABAR (*.)

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

(Institut Pasteur. Service des Vaccins.)

Dans un précédent mémoire [3] nous avons décrit les techniques utilisées pour obtenir le passage de l'état S à l'état R des *Salmonella*, et les différentes propriétés qui caractérisent ces formes R. Nous rapportons ici nos recherches sur leur constitution antigénique.

Après la perte de l'antigène O qui permettait une division en groupe du genre *Salmonella*, une classification sérologique est-elle toujours possible ? Ou bien l'antigène R dont l'existence, actuellement, n'est plus contestée, est-il dénué de spécificité ? Sur ce point, les avis divergent.

Selon Ide [10], les formes R peuvent être classées en 3 groupes, qu'il désigne par I, II et III.

Selon Boivin [2], au contraire, l'antigène R est identique pour toutes les *Salmonella*.

Quant à Henderson [9], il n'ose affirmer que les substances qu'il a extraites des formes rugueuses étudiées, représentent l'antigène typique des formes R.

Le problème reste donc posé : peut-on espérer, à partir des formes R des *Salmonella*, établir un diagnostic de groupe ?

Dans la première partie de notre travail, nous décrivons les techniques suivies pour obtenir des sérums anti-R, et titrer ensuite les anticorps qu'ils contiennent.

Dans la deuxième partie, nous exposons les résultats obtenus et leur interprétation.

TECHNIQUES SUIVIES.

A. IMMUNISATION DES LAPINS. — *Préparation des suspensions.* — A partir de cultures de vingt-quatre ou quarante-huit heures (sur

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 décembre 1952.

gélose à 7°), des suspensions en eau physiologique des germes ont été préparés selon 4 principes différents.

a) Avec des germes vivants, cultivés soit sur gélose ordinaire, soit sur gélose additionnée de sérum anti-H spécifique correspondant à l'espèce étudiée.

b) Avec des germes tués par addition de formol (II à III gouttes pour 20 ml de suspension).

c) Avec des germes tués par chauffage, deux heures et demie au bain-marie bouillant.

d) Avec des germes desséchés à l'acétone suivant une technique qui sera donnée plus loin.

Immunisation des lapins. — Les animaux ont reçu, tous les quatre jours, par voie intraveineuse, des doses croissantes de bacilles. Les lapins immunisés avec les germes secs ont reçu des doses doublées d'une fois à l'autre, soit 1 mg lors de la première injection ; 2 mg lors de la deuxième injection, etc.

Les lapins immunisés avec toutes les autres suspensions ont reçu des doses augmentées chaque fois de 2 000 000 000 de germes, la première injection étant de 1 000 000 000, et le total injecté atteignant en moyenne 50 000 000 000.

Une saignée d'épreuve a été pratiquée après la sixième ou la septième injection. Si le taux agglutinant du sérum était suffisant (de l'ordre de 800), l'animal était saigné à blanc huit jours après la dernière injection. Sinon, l'immunisation a été poursuivie jusqu'à ce qu'une nouvelle saignée d'épreuve indiquât le titre voulu.

PRÉPARATION DE SUSPENSIONS DE GERMES STABLES.

Obtenir des suspensions stables de formes R est évidemment assez difficile puisque, du fait qu'elles sont rugueuses, les souches auto-agglutinent. Pour éviter l'agglutination spontanée, différentes techniques ont été préconisées.

a) *Suspension en eau faiblement salée.* — Le procédé le plus couramment employé est celui qui consiste à émulsionner les germes dans de l'eau salée à 0,2 ou 0,1 p. 100, au lieu de 0,8 p. 100. Arkwright [4], Savage et White [42], Goyle [7] l'ont utilisé, ainsi que Gaselitz [6] qui, en outre, chauffe les suspensions à 100° pour se débarrasser de l'antigène H. La technique est très simple. Cependant, ces suspensions de bacilles en eau salée à 0,2 ou 0,1 p. 100 de ClNa ne demeurent stables, d'après Savage et White [42], que pendant dix-huit à vingt heures. Or, c'est le temps minimum au bout duquel la lecture peut être faite.

En outre, cette concentration saline, très faible nécessairement, pour empêcher la formation spontanée d'amas de germes, est peut-être insuffisante pour permettre une agglutination spécifique. Duncan [5] a montré, en effet, que si la concentration optimum

de ClNa requise pour que l'agglutination H se produise est relativement basse (M/28 p. 1 000, soit 2 p. 1 000 environ), celle requise pour l'agglutination O ou Vi est plus élevée.

Craignant de ne pas placer les éléments actifs dans les conditions optima pour que la réaction ait lieu, nous avons préféré ne pas employer cette méthode, malgré sa simplicité.

b) *Culture en bouillon agité*. — Krumwiede, Cooper et Provost [11] ont utilisé, pour leurs recherches, la culture en bouillon agité à laquelle ils ajoutaient 0,2 p. 100 de formol. Mais ils ont noté que, parfois, on voyait apparaître une sédimentation plus ou moins importante des germes dans le tube témoin. Nous n'avons donc pas essayé non plus cette technique.

c) *Procédé à l'alcool à 96°*. — Dès 1926, White [13, 14], après traitement des souches R par l'alcool à 96°, a obtenu des germes qui, remis en suspension dans de l'eau physiologique, formaient des suspensions stables, l'alcool agissant, d'après l'auteur, comme un solvant des substances hydrophobes (probablement des lipides). Crossley et ses collaborateurs [4] ont appliqué le procédé avec succès. Henderson [9] l'a utilisé également, tout en faisant quelques réserves quant aux résultats obtenus.

Nous avons donc voulu, à notre tour, suivre cette méthode pour préparer des suspensions stables de nos souches R. Nous avons recommencé cinq fois en modifiant chaque fois quelque détail pratique, tel que la façon d'ajouter l'eau distillée ou la durée de contact avec l'alcool, ou la préparation de l'alcool à 96° employé (craignant des erreurs dues aux impuretés possibles de l'alcool à 96° du commerce, nous avons, lors du dernier essai, préparé nous-mêmes cet alcool à partir de l'alcool absolu, distillé au laboratoire). Cinq fois nous avons enregistré un échec. La remise en suspension des germes secs dans l'eau distillée a été impossible : nous avons obtenu une suspension à gros grumeaux que n'ont désintégrés ni un contact prolongé avec l'eau (quarante-huit heures), ni une forte agitation avec des billes de verre.

Nous avons alors tenté d'utiliser l'alcool, selon la technique utilisée pour la préparation des suspensions O des souches lisses. La culture de vingt-quatre heures, sur gélose inclinée, était émulsionnée dans de l'eau physiologique additionnée d'un volume égal d'alcool à 96°, puis remise à l'étuve pendant vingt-quatre heures. La suspension finale était préparée en diluant, avec de l'eau physiologique, cette émulsion alcoolique, de telle sorte que la teneur en corps microbiens fut de 4 à 500 000 000 de germes par ml.

Nous avons ainsi préparé des suspensions stables avec 6 de nos souches : A 104, B 3, C 301, Newport, R 2, T 68. Par contre, les germes des 9 autres souches se sont très rapidement agglutinés. Il n'était donc pas possible, encore, d'appliquer cette méthode.

d) *Méthode à l'acétone.* — Nous avons alors pensé à dessécher les germes, non plus avec de l'alcool qui, dans nos expériences, a laissé intactes les propriétés hydrophobes des formes R, mais avec de l'acétone.

Nous avons opéré selon le protocole suivant :

La culture de quarante-huit heures sur gélose ordinaire, en boîtes de Roux, était traitée, après centrifugation pour éliminer l'eau physiologique ayant servi à récolter les germes, par de l'acétone (500 à 700 ml environ pour 50 boîtes de Roux). Après un contact de vingt minutes à une demi-heure et centrifugation, l'acétone était renouvelée, et l'opération recommencée ainsi trois fois. Puis, les bacilles étaient laissés à la température du laboratoire, en ayant soin d'agiter très fréquemment les germes avec une baguette de verre au cours de la dessiccation, faute de quoi le produit obtenu était plus ou moins corné et inutilisable.

Après pulvérisation finale, au mortier, les microbes se présentaient sous la forme d'une poudre fine, presque blanche, de conservation pratiquement indéfinie à la température du laboratoire.

Préparation de la suspension pour le titrage. — 8 à 10 mg de germes secs étaient mis en suspension dans 3 ml d'eau physiologique, de la façon la plus homogène possible, en opérant de la manière suivante : les 3 ml d'eau étaient versés dans un tube de 17, et la poudre pesée délayée délicatement dans les quelques gouttes restées à l'entrée du tube. On obtenait ainsi une couche très mince de pâte semi-liquide et homogène. Le tube était alors incliné plusieurs fois. Les quelques millilitres d'eau physiologique venaient en contact avec les germes hydratés, et il se formait une suspension épaisse. Il suffisait alors, pour l'utilisation, de la diluer avec de l'eau physiologique, de façon que l'opacité corresponde à 500 000 000 de germes environ.

Les suspensions ainsi préparées étaient homogènes et stables pendant au moins trois jours. (Toutefois, la lecture des réactions d'agglutination ne se faisant qu'après deux heures d'étuve et vingt-quatre heures à la température du laboratoire, il nous semble préférable de ne pas utiliser des suspensions datant de plus de quarante-huit heures ; dans toutes nos expériences, nous n'avons d'ailleurs employé que des suspensions préparées extemporanément, afin d'être sûres que le tube témoin serait négatif).

La stabilité n'était pas la seule condition que devaient remplir les suspensions destinées au titrage des sérums. Elles devaient être également, nous l'avons déjà dit, sensibles et spécifiques.

Etude de la sensibilité. — Nous avons comparé les titres de deux de nos sérums anti-R, vis-à-vis de suspensions R alcooliques stables, et vis-à-vis de suspensions de germes desséchés à l'acétone.

Voici nos résultats :

TABLEAU I.

Souches	Sérum 027 Corr. à la souche T 68		Sérum 032 Corr. à la souche C 301	
	Suspensions alcooliques	Susp. de ger- mes desséchés à l'acétone	Suspensions alcooliques	Susp. de ger- mes desséchés à l'acétone
A 104	400	400	800	3.200
B 3	200	400	800	1.600
C 301	200	400	400	1.600
Newport	400	400	200	1.600
T 68	400	400	800	100
R ₂	100	100	100	1.600

Le sérum O 27 correspondait à la souche T 68 ;

Le sérum O 32 correspondait à la souche C 301.

On voit que, à part une exception (souche T 68 avec le sérum O 32), les suspensions de germes traités à l'acétone agglutinaient en général à des titres plus élevés que ne le faisaient les suspensions alcooliques des mêmes souches, témoignant ainsi de la sensibilité recherchée.

Etude de la spécificité. -- Pour être spécifiques, les suspensions ne devaient pas donner de résultats positifs avec des agglutinines autres que les agglutinines R.

Ainsi, un sérum contenant des agglutinines O et H de *S. paratyphi A*, par exemple, devait rester sans action sur la suspension de germes secs de *S. paratyphi A* rugueux.

Nous avons donc éprouvé nos suspensions de souches desséchées à l'acétone par des sérums anti-O des groupes A, B, C, D et anti-H de germes secs de *S. paratyphi A* rugueux.

Tous les résultats ont été négatifs.

Les suspensions n'agglutinant ni avec les sérums anti-O, ni avec les sérums anti-H, nous pouvons donc affirmer que les agglutinations observées avec les sérums anti-R étaient bien spécifiques.

Stables, sensibles, spécifiques, ces suspensions nous ont alors paru propres à l'étude des anticorps des sérums anti-A.

B. AGGLUTINATIONS R. — *Etuve.* — Des dilutions croissantes de sérums (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640) étaient préparées et, après mélange avec les suspensions dans les proportions de 0,1 de dilution et 0,9 de suspension (ce qui donnait des dilutions finales de sérum de 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1 600, 1/3 200, etc.), les tubes étaient laissés deux heures à l'étuve à 37°, puis vingt-quatre heures à la température du laboratoire.

La lecture était faite à ce moment-là, à l'agglutinoscope.

Quelquefois, dans le cas de sérums de titre élevé, une agglutination pouvait s'observer, aussitôt après les deux heures d'étuve, dans les premiers tubes, c'est-à-dire ceux correspondant aux

dilutions de sérum les plus faibles. Mais en général, la réaction avait lieu plus lentement. Toutefois, il nous a paru inutile de retarder la lecture au delà de vingt-quatre heures, car les titres observés après quarante-huit heures n'étaient pas supérieurs à ceux notés la veille.

Centrifugation. — Nous avons également recherché si l'on pouvait procéder au titrage des sérums R en appliquant la technique de centrifugation utilisée pour le séro-diagnostic rapide des infections à *Salmonella* (M^{me} J. Grabar et A. Bonnefoi) [8]. Les tubes étaient centrifugés pendant cinq minutes, à la vitesse de 3.000 tours par minute. Le culot de centrifugation était remis en suspension par un très léger choc sur la partie inférieure du tube. La lecture était faite comme précédemment, à l'agglutinoscope.

Le tube témoin, sans sérum, étant négatif après la centrifugation, les résultats étaient valables. Nous les avons comparés avec ceux qui étaient obtenus par la technique à l'étuve. A de rares exceptions près, ils étaient identiques, ou légèrement supérieurs, la méthode par centrifugation s'avérant ainsi un peu plus sensible.

Toutefois, au cours de notre travail, nous n'avons utilisé que le procédé à l'étuve, plus long, mais moins violent, et tous les résultats fournis ont été obtenus après deux heures à 37° et vingt-quatre heures à la température du laboratoire.

Comment se présentait l'agglutination R ?

Macroscopiquement, par son aspect, elle était intermédiaire entre l'agglutination O et l'agglutination Vi ; on voyait des agglomérats plus ou moins granuleux, très fins. Par contre, leur fragilité était comparable à celle d'agglutinats du type H.

Au microscope, ces agglutinats apparaissaient constitués par des germes réunis bout à bout, mais formant, à angles assez aigus, des chaînes extrêmement courtes, de 4 à 6 éléments, très enchevêtrées, le tout représentant alors des amas très irréguliers.

C. SATURATION DES SÉRUMS. — Nous avons employé également les germes desséchés à l'acétone pour saturer nos sérums. Les germes, préalablement hydratés en eau physiologique, étaient laissés en contact avec le sérum dilué au 1/10 pendant deux heures à 37° et vingt-quatre heures à + 4°. Le sérum était alors débarrassé des corps microbiens par centrifugation et un titrage vis-à-vis de la souche ayant servi à la saturation montrait que celle-ci était totale.

Nous avons pu observer, ainsi que White [14] le faisait déjà remarquer en 1926, le pouvoir absorbant assez bas des souches R. Pour saturer un sérum d'un titre donné, il était nécessaire d'employer environ trois à quatre fois plus de germes qu'il n'en aurait fallu pour épuiser un sérum anti-S, avec la souche correspondante.

RÉSULTATS OBTENUS.

Nous avons préparé des sérums avec des germes des 4 groupes A, B, C, D, et nous avons titré leurs agglutinines vis-à-vis des suspensions R de nos souches, ainsi que vis-à-vis des suspensions spécifiques O et H de *Salmonella typhi* et des *Salmonella para-*

TABLEAU II.

Suspension des souches	SÉRUMS						
	G 119 corresp à A 104 g. secs	G 120 corresp à B 3 g. secs	O 32 corresp à C 301 g. form	O 34 corresp Newport g. form	O 27 corresp à T 68 g. viv.	O 31 corresp à T 68 g. viv. s/gel. +Serum anti d	O 28 corresp à T 68 g. chauff.
A O	100		-	-	-	-	-
A H	25.600		-	-	-	-	-
B O	-		-	-	-	-	-
B H	-		-	200	-	-	-
C O	-		-	-	-	-	-
C H	-		-	200	-	-	-
T O	-		-	-	-	-	-
T H	-		-	-	6.400	200	-
A 4	3.200	100	1.600	800	400	800	400
A-102	3.200	100	3.200	800	800	400	400
A 104	3.200	100	3.200	1.600	400	1.600	400
A 503	3.200	100	1.600	400	400	800	200
B 3	3.200	100	1.600	400	400	400	400
Essen 173	3.200	100	1.600	400	400	400	400
C 301	3.200	100	1.600	200	400	800	400
C 404	3.200	100	1.600	400	400	200	100
C 406	1.600	-	400	200	200	100	400
Newport	3.200	100	1.600	800	800	1.600	800
Thompson	3.200	100	1.600	400	400	800	400
T 68	3.200	100	100	400	200	800	800
T 346	3.200	100	800	200	400	400	400
R 2	3.200	100	1.600	400	400	800	400
Panama	3.200	100	800	400	400	400	400

Le sérum G 119 correspondant à la souche de *S. para* A : A 104 (germes secs).
Le sérum G 120 correspondant à la souche de *S. para* B : B 3 (germes secs).

Le sérum O 32 correspondant à la souche de *S. para* C : C 301 (suspension formolée).

Le sérum O 34 correspondant à la souche de *S. Newport* (représentant le sous-groupe VI, VIII). N. Porto Rico (suspension formolée).

Le sérum O 27 correspondant à la souche de *S. typhi* : T 68 (germes vivants).

Le sérum O 31 correspondant à la souche de *S. typhi* : T 68 (germes vivants cultivés sur gélose additionnée de sérum anti-d).

Le sérum O 28 correspondant à la souche de *S. typhi* : T 68 (germes chauffés).

typhi A, B et C, préparées au Centre des *Salmonella* de l'Institut Pasteur (le titre de tous ces sérums vis-à-vis de toutes les suspensions utilisées était, naturellement, nul avant l'injection des germes aux lapins).

Les résultats sont résumés dans le tableau II.

D'après ces résultats on voit que :

1° *Agglutinines O*. — Les sérums correspondant aux souches R ne contiennent pas d'agglutinines O en général ; ou, s'ils en contiennent (sérum G. 119 : AO=100), c'est à un titre très faible. Ceci confirme donc l'état complètement R de nos souches.

2° *Agglutinines H*. — Les sérums préparés avec des souches rugueuses contiennent des agglutinines H si les antigènes H ne sont pas détruits par chauffage et si les souches sont mobiles.

Ex. S. O 27 : TH = 6 400

S. O 34 : BH = 200

Les suspensions BH et CH contenant du 1,2 ou du 1,5 sont agglutinées par le sérum correspondant à une souche ayant du 1,2.

Le fait que la souche C 301, injectée sous forme de suspension formolée, n'a pas donné naissance à des anticorps H (S. O 32 CH=O) est probablement dû à la très faible mobilité des germes, vérifiée microscopiquement et par ensemencement sur gélose molle.

Le titre du sérum G 119 en agglutinines « a » (AH=25 600) mérite de retenir notre attention. On voit que, injectés à l'animal, les germes secs provoquent la formation d'agglutinines H, tandis qu'ils ne sont pas agglutinés par les sérums correspondant à leur antigène H : nous l'avons remarqué précédemment, à propos de la spécificité des suspensions R.

3° *Agglutinines R*. — La manière dont a été préparée la suspension injectée ne semble guère avoir d'importance quant au titre en agglutinines R du sérum.

C'est le sérum G 119, obtenu à partir de germes secs, qui a le titre le plus élevé (3 200). Mais l'emploi de ces bactéries desséchées a l'inconvénient de permettre la formation d'anticorps H qui peuvent être gênants si l'on cherche à étudier les anticorps R seulement. De plus, le sérum G 120 (correspondant à la souche B 3) préparé selon ce procédé, a un titre très faible. (Il est vrai que nous avons essayé de préparer d'autres sérums avec la souche B 3 en utilisant également soit une suspension formolée, soit une suspension chauffée, et jamais, avec cette souche, le titre des sérums obtenus n'a dépassé 100).

Il semble alors que la meilleure façon d'obtenir des sérums riches en anticorps R consiste à injecter une culture de quarante-huit heures d'une souche complètement R après l'avoir chauffée deux heures et demie à 100° afin d'éviter la formation d'anticorps H.

Nous avons été obligées de renoncer à préparer un sérum correspondant au groupe B : les multiples injections de la souche B 3 — nous l'avons déjà mentionné ci-dessus — n'ont pu provoquer l'élaboration d'anticorps à un taux suffisant pour qu'on puisse tenir compte des résultats obtenus.

Les 6 autres sérums étudiés sont l'un du groupe A, les 2 autres du groupe C, les 3 derniers du groupe D.

Le pouvoir agglutinant de ces sérums vis-à-vis de toutes nos souches R est différent. Plusieurs causes peuvent être invoquées pour expliquer cela : réaction individuelle des animaux, pouvoir antigénique variable des souches choisies.

Cependant, si on considère séparément chaque sérum et le titre de celui-ci vis-à-vis des 15 souches R de *Salmonella* étudiées, on constate :

1° Que ce titre, malgré la grosse quantité de germes injectés, reste relativement assez bas (voisin de 800), c'est-à-dire inférieur à celui qui est obtenu souvent pour les sérums anti-O ;

2° Que les résultats sont sensiblement les mêmes vis-à-vis de toutes les souches, qu'elles appartiennent au même groupe que la souche injectée ou à un groupe différent. Il arrive même que des souches hétérologues agglutinent à un titre supérieur à celui qui correspond à la souche homologue :

Ex. : S. O 32 correspondant à C 304 { titre avec C 304 = 1 600.
titre avec A 104 = 3 200.

S. O 27 correspondant à T 68 { titre avec T 68 = 200.
titre avec Newport = 800.

S. O 31 correspondant à T 68 { titre avec T 68 = 800.
titre avec Newport = 1 600.
titre avec A 104 = 1 600.

Si on ne peut donc encore conclure que l'antigène R est le même pour toutes les *Salmonella*, il semble toutefois qu'on puisse dire que les souches R de *Salmonella* du même groupe ou de groupes différents (tout au moins celles des groupes A, B, C et D) ont un antigène commun.

Cet antigène est-il unique ? Ou bien les différents groupes ont-ils, en dehors d'un antigène commun, un ou plusieurs antigènes spécifiques du groupe, voire d'espèce ?

Seule, la saturation permettra de répondre.

Deux hypothèses sont possibles :

1° Ou cet antigène est unique, et la saturation des sérums par une quelconque des souches doit enlever toutes les agglutinines.

2° Ou, au contraire, il se compose de deux parties, l'une commune à tous les groupes, l'autre spécifique de groupe ou d'espèce ; la saturation par une souche hétérologue doit alors

enlever la première partie, laisser intacte la deuxième et le sérum doit encore avoir des agglutinines de groupe ou d'espèce décelables avec la souche homologue.

Nous avons donc saturé 4 de nos sérums représentant chacun un groupe différent.

Le sérum G 119 correspondant au groupe A,

Le sérum O 32 correspondant au groupe C 1.

Le sérum O 34 correspondant au groupe C 2.

Le sérum O 27 correspondant au groupe D.

Ils ont été absorbés, d'une part avec la souche ayant servi à préparer le sérum (ceci afin de vérifier qu'il était possible d'épuiser totalement celui-ci ; car si cela n'avait pas été réalisable, la mise en évidence d'agglutinines résiduelles, après absorption par une souche hétérologue, n'aurait eu aucune signification), d'autre part avec une souche quelconque d'un groupe différent.

Nous avons opéré, pour chaque saturation, avec 15 ml de sérum dilué au 1/10.

Le sérum G 119 (gr. A) a été traité par	<div> <div>750 mg de corps bactériens de S. paratyphi A 104.</div> <div>750 mg de corps bactériens de S. Thompson.</div> </div>
Le sérum O 32 (gr. C ₁) a été traité par	<div> <div>800 mg de corps bactériens de S. paratyphi C 301.</div> <div>850 mg de corps bactériens de S. paratyphi A 104.</div> </div>
Le sérum O 34 (gr. C ₂) a été traité par	<div> <div>600 mg de corps bactériens de S. Newport.</div> <div>750 mg de corps bactériens de S. paratyphi A 503.</div> </div>
Le sérum O 27 (gr. D) typhique, a été traité par	<div> <div>600 mg de corps bactériens de S. typhi T 68.</div> <div>600 mg de corps bactériens de S. Newport.</div> <div>600 mg de corps bactériens de S. paratyphi A 102.</div> </div>

Nous avons ensuite titré ces sérums saturés vis-à-vis des suspensions de toutes nos souches R.

Tous les résultats ont été négatifs.

Nous constatons donc une remarquable homogénéité des résultats. Quel que soit le sérum étudié, toutes les agglutinines sont enlevées, soit par la souche homologue — ce qui est normal —, soit par une souche hétérologue quelconque. Il apparaît donc *toutes les Salmonella R possèdent* — en dehors de l'antigène H différent selon les espèces — *un unique antigène R, le même pour tous les groupes.*

Ces résultats, obtenus après une étude basée sur l'agglutination, sont donc en accord avec ceux qu'avaient présentés

Boivin [2], qui, lui, avait travaillé en utilisant la précipitation après extraction de l'antigène.

Boivin [2], de plus, avait noté l'existence de cet antigène R également dans les formes S des *Salmonella*.

Nous avons cherché, alors, si l'agglutination permettait également de déceler la présence de l'antigène R dans les variantes S des *Salmonella*.

Nous avons donc préparé des germes desséchés à l'acétone avec des souches lisses des 4 groupes A, B, C, D et nous avons étudié leur comportement — par agglutination — vis-à-vis du sérum G 119, le plus riche en agglutinines R, son titre étant de 3 200. Voici les résultats (tableau III).

TABLEAU III.

SUSPENSION DES SOUCHES DÉSSÉCHÉES	TITRE VIS-A-VIS DU SÉRUM G 119
A 1 015	800
B 809	200
Essen	100
Newport	200
C 206	200
T 416	200

On voit que les souches étudiées donnent un résultat positif. Le titre trouvé est naturellement plus faible que le titre réel du sérum en agglutinines R, car dans les formes S, l'antigène R est pratiquement recouvert par l'antigène O (et, éventuellement, par l'antigène Vi) et les manifestations de sa présence sont presque inhibées par celles de l'antigène O. Mais il est cependant possible de le mettre en évidence par la technique d'agglutination, comme par celle de précipitation. Il semble donc permis d'affirmer que cet antigène R est toujours présent chez toutes les *Salmonella*, sous quelque forme qu'elles soient. Dans les formes rugueuses, il est seul, à côté de l'antigène ciliaire, qui, lui, reste à peu près inaffecté par le changement d'état des souches. Dans les formes lisses, il existe également, mais, enrobé par l'antigène O, il est plus difficile de le déceler.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Afin d'étudier la constitution antigénique des variantes R des *Salmonella*, nous avons recherché un procédé permettant de préparer, à partir des germes à l'état R, les suspensions stables, spécifiques et sensibles nécessaires pour effectuer des agglutinations. Nous utilisons finalement, après maints essais infruc-

tueux, la technique de dessiccation des corps microbiens par l'acétone qui permet d'obtenir une agglutination convenable.

Nos résultats expérimentaux mettent en évidence un antigène R unique, commun à toutes les *Salmonella* ; une classification sérologique des formes R ne paraît donc pas possible.

Nous montrons enfin, toujours par la technique d'agglutination, l'existence de cet antigène R chez les formes lisses des *Salmonella*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. A. ARKWRIGHT. *J. Path. a. Bact.*, 1919-1920, **23**, 358.
- [2] A. BOIVIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **209**, 494.
- [3] M^{me} S. BEGUIN et M^{me} J. GRABAR. *Ces Annales*, 1952, **83**, 539.
- [4] V. M. CROSSLEY, M. FERGUSON et L. BRYDSON. *J. Bact.*, 1946, **52**, 367.
- [5] J. T. DUNCAN. *Brit. J. exp. Path.*, 1937, **18**, 108.
- [6] F. H. GASELITZ. *Zeitschr. Hyg.*, 1949-1950, **130**, 223.
- [7] A. N. GOYLE. *J. Path. a. Bact.*, 1926, **29**, 149.
- [8] M^{me} J. GRABAR et A. BONNEFOI. *Ces Annales*, 1946, **72**, 745.
- [9] D. W. HENDERSON. *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 11.
- [10] M. IDE. *Kitasato Archives exp. Med.*, 1938, **15**, n° 1, 16.
- [11] Ch. KRUMWIEDE, G. COOPER et D. J. PROVOST. *J. Immunol.*, 1925, **10**, 55.
- [12] W. G. SAVAGE et P. B. WHITE. *Med. Res. Council.*, 1925, **91**, 53.
- [13] P. B. WHITE. *J. Path. a. Bact.*, 1927, **30**, 113.
- [14] P. B. WHITE. *Med. Res. Council*, 1926, **103**, 50.

**LE MÉTABOLISME DE DÉGRADATION
DU 2-3 BUTANEDIOL
ET DE L'ACÉTOÏNE PAR LES MICROBES :
CAS DE *NEISSERIA WINOGRADSKYI*.**

I. — ÉTUDE DE LA 2-3 BUTANEDIOL DÉSHYDROGÉNASE

par J.-P. AUBERT et R. GAVARD (*).

(Institut Pasteur, Service des Fermentations.)

Le 2-3 butanediol et l'acétoïne existent dans les milieux biologiques les plus divers, liquides de fermentations microbiennes, plantes, sang, sol, etc. Un article précédent publié par l'un de nous en collaboration avec d'autres chercheurs [7] comporte une bibliographie de la question et contient une étude, dans le cas de *Bacillus subtilis*, de l'influence des conditions extérieures sur l'accumulation et la disparition de ces composés. Dans un autre article [6] nous avons montré que le 2-3 butanediol peut servir d'aliment carboné à *Bacillus megatherium*, et l'un de nous a étudié plus précisément les modalités générales et le rendement de la croissance de *B. megatherium* cultivé en présence de ce substrat [4]. Plus récemment Lemoigne et coll. [9], au cours de leurs études d'écologie microbienne, ont isolé de la terre, par l'emploi de la méthode au silicogel de Winogradsky, une bactérie jusqu'alors non décrite et désignée par eux sous le nom de *Neisseria winogradskyi*, qui possède une grande affinité pour le 2-3 butanediol et l'acétoïne. Il ne fait pas de doute que, dans les conditions naturelles, cette bactérie joue un rôle important dans la dégradation du 2-3 butanediol ou de l'acétoïne formés par d'autres microorganismes.

La facilité avec laquelle cette bactérie se développe dans un milieu synthétique simple contenant le 2-3 butanediol comme seul aliment carboné et le caractère rationnel lié à son origine, nous ont inclinés à l'utiliser pour notre étude enzymologique de dégradation du 2-3 butanediol, plutôt que les bactéries que nous avions déjà employées, *B. subtilis* et *B. megatherium*, qui n'utilisent le 2-3 butanediol que dans des circonstances particulières.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 janvier 1953.

Le présent mémoire a pour objet l'étude de la première étape de dégradation, la transformation du 2-3 butanediol en acétoïne, et de l'enzyme qui en est responsable : la 2-3 butanediol déshydrogénase. Cet enzyme est vraisemblablement largement répandu, cependant sa nature et ses propriétés n'ont jamais été étudiées. Nous avons publié sur ce sujet une note préliminaire [2] et Gunsalus et coll. [4], dans un récent travail sur la fermentation hétérolactique du glucose par *Leuconostoc mesenteroides*, signalant la présence de cette déshydrogénase dans un extrait enzymatique obtenu par ultrasonation des bactéries.

TECHNIQUES.

1° PRODUITS. — Le 2-3 butanediol brut utilisé provient de la firme « N. V. Nederlandsche Gist et Spiritus Fabriek » (Delft) ; il est composé environ de 90 p. 100 de l'isomère meso, 8 p. 100 de l'isomère *d* et 2 p. 100 de l'isomère *l*. A partir de ce produit, nous avons préparé, par la méthode de Neish [11], l'isomère meso à l'état pur, et un mélange contenant environ 75 p. 100 de l'isomère *d* et 25 p. 100 de l'isomère *l*.

Nous devons le 2-3 butanediol pur à l'obligeance du Dr G. A. Ledingham que nous remercions ici.

Le DPN (30 p. 100 de pureté) a été préparé à partir de la levure de boulangerie selon la méthode publiée par Le Page [3].

2° DOSAGES. — Le 2-3 butanediol, l'acétoïne et le diacétyl sont dosés par la méthode de Hooreman [5], le phosphore par la méthode de Fiske et Subbarow [8].

3° CULTURE DES MICROBES. — Le milieu de culture a la composition suivante :

PO_4KH_2	5 g
NO_3K	10 g
SO_4Mg , 7 H_2O	0,150 g
SO_4Fe , 4 H_2O	0,030 g
SO_4Mn , 7 H_2O	0,030 g
2-3 butanediol (brut)	20 g
NaOH (10 N)	4 ml
Eau de source	Q S. P. 1 l

La valeur du pH se trouve vers 6,0. Ce milieu est réparti par fractions de 100 ml dans des fioles d'Erlenmeyer de 1 l. L'ensemencement provient d'une culture de vingt-quatre heures sur le même milieu gélosé. Les fioles sont agitées mécaniquement à l'étuve à 30° pendant seize heures. A partir de 1 l de culture on obtient en moyenne 4 g de microbes secs.

4° PRÉPARATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE. — Les microbes sont récoltés par centrifugation dans une super-centrifugeuse « Sharples » et séchés immédiatement avec de l'acétone froide. Les poudres acétoniques gardées à -5° conservent leur activité pendant plusieurs semaines. L'extrait est obtenu par autolyse : les microbes séchés sont mis en suspension dans du tampon phosphate M/15 à pH 7,0 (20 ml de tampon par gramme de microbes). La suspension est laissée sous vide à 37° pendant six heures. Après centrifugation à haute vitesse (centrifugeuse Servall SS 1), on obtient par gramme de microbes 12 à 13 ml d'extrait brut (1,0 mg d'azote par millilitre) qui, congelé, est très stable. L'extrait brut est purifié par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium entre 0,32 et 0,70 de saturation. Le précipité est dissous dans l'eau et la solution est dialysée une nuit à 5° contre eau bidistillée. 50 ml d'extrait brut fournissent 25 ml d'extrait fractionné (0,9 mg d'azote par millilitre). Cet extrait renferme 85 p. 100 de l'activité de l'extrait brut.

5° MESURE DE L'ACTIVITÉ. — En aérobiose, on mesure la fixation d'oxygène par la technique de Warburg, en anaérobiose on suit la formation du DPN réduit en observant l'absorption à 340 m μ avec un spectrophotomètre de Beckman.

RÉSULTATS.

1° CORRESPONDANCE 2-3 BUTANEDIOL, ACÉTOÏNE, OXYGÈNE. — On n'observe une fixation d'oxygène en présence de 2-3 butanediol que si l'on ajoute à l'extrait fractionné du bleu de méthylène et du DPN. On sait que le transport de l'hydrogène entre le DPN réduit et le bleu de méthylène est réalisé par la diaphorase de Straub [13]. Au degré de purification de notre extrait il est inutile d'ajouter la diaphorase.

Le tableau I rapporte les résultats.

TABLEAU I. — Absorption d'oxygène et formation de l'acétoïne.

TEMPS (min.)	O ₂ absorbé (μ mol.)	BUTANEDIOL disparu (μ mol.)	ACÉTOÏNE formée (μ mol.)	DIACÉTYLE formé (μ mol.)	O ₂ /ACÉTOÏNE
10	3,4				
20	5,2	10,9	11,0	0	0,47
30	6,8	12,6	12,4	0	0,54
40	7,7	17,5	17,1	0	0,45

Extrait enzymatique fractionné : 0,35 ml (0,3 mg N); phosphate disodique 0,02 M : 0,4 ml; meso 2-3 butanediol sol. à 2 p. 100 : 0,4 ml; bleu de méthylène sol. à 0,5 p. 100 : 0,2 ml; DPN (purété 30 p. 100) : 1 mg. Vol. final : 2,0 ml; pH 8,2. Air. 37° .

L'extrait enzymatique réalise donc la seule transformation du 2-3 butanediol en acétoïne.

2° NÉCESSITÉ DE L'ADDITION DU DPN. — Le 2-3 butanediol déshydrogénase est un enzyme dont le DPN est le coenzyme. On voit sur la figure 1 l'influence de l'addition de quantités croissantes de DPN à la protéine. L'emploi de l'hydroxylamine qui fixe l'acé-

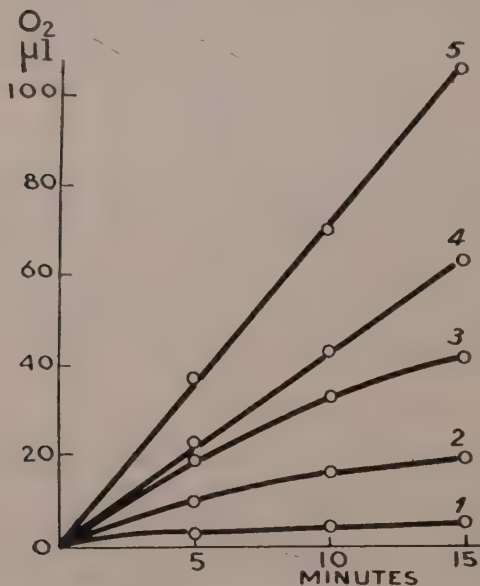


FIG. 1. — Extrait enzymatique fractionné : 0,4 ml (0,36 mg N); phosphate disodique 0,02 M : 0,4 ml; meso 2-3 butanediol sol. à 4 p. 100 : 0,4 ml; bleu de méthylène sol. à 0,5 p. 100 : 0,2 ml; $ClH\ NH_2OH$ sol. à 2,5 p. 100 neutralisée à pH 7,0 : 0,2 ml. Vol. final 2,0 ml. Addition de DPN (pureté 30 p. 100) selon les expériences : courbe 1 : pas de DPN; courbe 2 : 0,05 mg; courbe 3 : 0,1 mg; courbe 4 : 0,2 mg; courbe 5 : 0,5, 1, 2 et 5 mg. pH 7, 9. Air. 37°.

toïne formée permet d'obtenir une absorption d'oxygène proportionnelle au temps pendant trente minutes.

3° SPÉCIFICITÉ. — Le tableau II rapporte les résultats.

La spécificité est relativement large puisque l'enzyme est également actif sur les 3 isomères du 2-3 butanediol et qu'il est plus actif sur le 1-2 propanediol que sur le 2-3 butanediol. Remarquons que l'oxydation du 1-2 propanediol par des bactéries qui oxydent le 2-3 butanediol a déjà été signalée par Stanier [12].

TABLEAU II. — Action de la 2-3 butanediol déshydrogénase sur différents substrats.

SUBSTRATS ($c = 0,09$ M)	ACTIVITÉ
Méso 2-3 butanediol	100
<i>l</i> 2-3 butanediol	100
Mélange formé de 25 p. 100 de <i>l</i> et 75 p. 100 de <i>d</i> 2-3 butanediol	100
<i>dl</i> 1-3 butanediol	8
Ethanol	0
Sorbitol	0
Glycol	0
Glycérol	10
<i>dl</i> 1-2 propanediol	180
Glucose	0
Acide malique	0
Acide lactique	0

4° POUVOIR ROTATOIRE DE L'ACÉTOÏNE FORMÉE. — I. *Cas du méso 2-3 butanediol.* — Dans une fiole d'Erlenmeyer de 2 l, on met 175 ml d'extrait brut amené à pH 7,8, à quoi on ajoute 5 g de méso 2-3 butanediol et 150 mg de bleu de méthylène (5 ml). Le mélange est agité mécaniquement pendant une heure trente dans une étuve à 38°. La quantité d'acétoïne formée est de 212 mg.

Le mélange est refroidi à 5° et déféqué à l'hydrate de zinc. On centrifuge à la chambre froide et on lave le précipité avec de l'eau glacée. Le liquide surnageant est amené à pH 5 avec de l'acide sulfurique dilué, et distillé à 35° sous 20 mm de Hg et barbotage d'azote. On obtient 280 ml d'une solution contenant 0,460 mg d'acétoïne par millilitre.

$$\alpha = +6,5' (c = 0,046 \text{ p. } 100, l = 3) [\alpha]_D^{20} = +78^\circ.$$

La concentration en acétoïne peut être augmentée par formation de la liaison bisulfite. On ajoute au distillat 10 ml d'une solution de bisulfite de sodium à 30 p. 100 et concentre le mélange dans les mêmes conditions que précédemment. La distillation est poursuivie jusqu'à début de précipitation. On reprend le résidu avec un peu d'eau, et on ajoute du bicarbonate de soude jusqu'à cessation du dégagement gazeux. On amène le liquide à pH alcalin (rose à la phtaléine) avec NaOH, 3 N. On distille à nouveau dans les mêmes conditions, et on obtient 12 ml d'une solution contenant 7,6 mg d'acétoïne par millilitre.

$$\alpha = +1^\circ, 43' (c = 0,76 \text{ p. } 100, l = 2) [\alpha]_D^{20} = +80^\circ.$$

II. *Cas du l 2-3 butanediol.* — La technique est la même que pour l'isomère méso. Avec le *l* 2-3 butanediol, on obtient de la *l* acétoïne.

$$\alpha = -41' (c = 0,804 \text{ p. } 100 \text{ } l = 1) [\alpha]_D^{20} = -85^\circ.$$

5° INFLUENCE DU pH. — La figure 2 représente l'activité de la déshydrogénase en fonction du pH. On voit que l'enzyme présente un maximum d'activité en pointe vers pH 8,5.

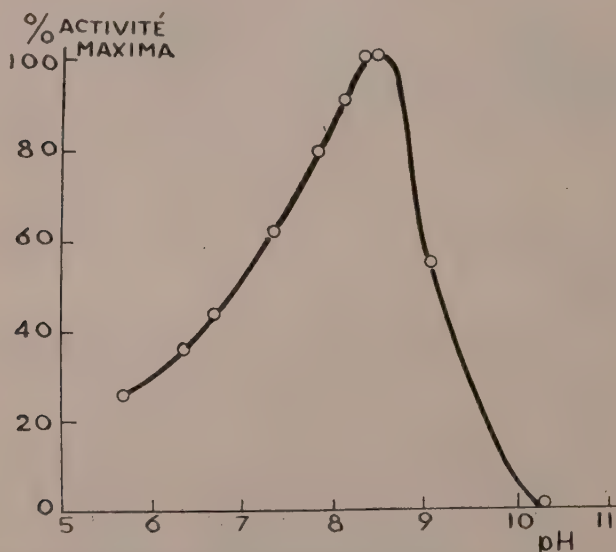


FIG. 2. — Normes habituelles. Tampon phosphate 0,05 M de pH 5,4 à pH 8,4. Tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane, ClH de pH 8,4 à pH 10,6.

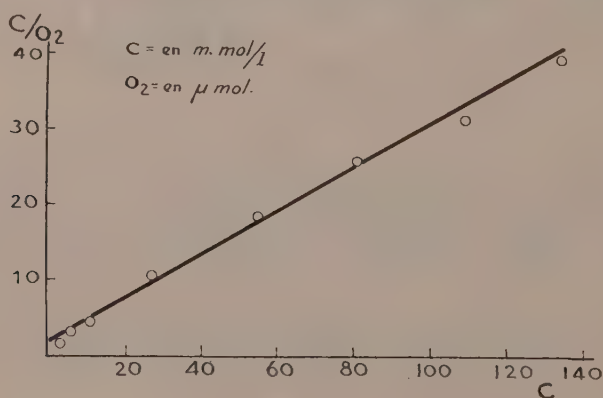


FIG. 3.

6° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PHOSPHATE. — La variation de la concentration en phosphate entre 1.10^{-5} M et 0,05 M n'a aucune influence sur l'activité de l'enzyme.

7° CONSTANCE DE DISSOCIATION ENZYME-2-3 BUTANEDIOL. — Le tableau III et la figure 3 rapportent les résultats.

TABLEAU III. — Influence de la concentration du substrat.

CONCENTRATION (m. mol./l)	O ₂ ABSORBÉ (10 MIN.) (μ mol.)
135	3,44
110	3,53
81	3,42
55	2,95
27	2,50
11	2,32
5,5	1,83
2,7	1,52

Extrait enzymatique fractionné : 0,4 ml (0,36 mg N); phosphate disodique 0,02 M : 0,4 ml; meso 2-3 butanediol : 0,4 ml; bleu de méthylène à 0,5 p. 100 : 0,2 ml; DPN (pureté 30 p. 100) : 1 mg; ClH, NH₂OH 0,035 M neutr. à pH 7,0 : 0,2 ml. Vol. final 2,0 ml. pH 7,9. Air. 37°. Le 2-3 butanediol est mis au départ dans le compartiment central. La réaction est déclenchée par addition du DPN qui se trouve dans la tubulure latérale.

D'après la courbe représentée sur la figure 3, la constante de dissociation peut être calculée selon la méthode de Lineweaver et Burk [40].

$$K_s/V = 2,0 \quad I/V = 0,28 \quad K_s = 2,0/0,28 = 7,1 \text{ m. mol./l} = 0,007 \text{ M.}$$

8° RÉVERSIBILITÉ DE LA RÉACTION. — La réversibilité de la

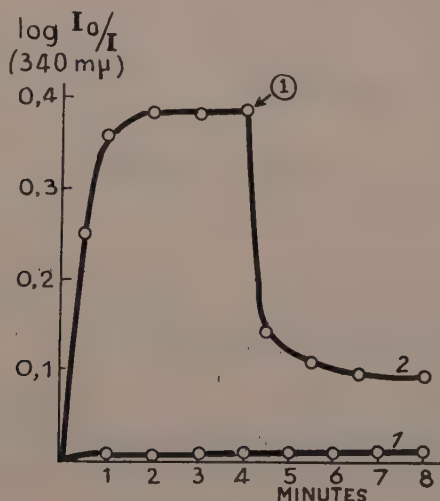


FIG. 4. — Cuve $d = 1,0$ cm. $T = 20^\circ$. Tampon phosphate M/15 pH 7,9 : 1,5 ml; meso 2-3 butanediol sol. à 5 p. 100 : 0,4 ml; extrait enzymatique fractionné : 0,02 ml (0,2 mg N); DPN (pureté 30 p. 100) 0,4 ml (2 mg par ml); eau 0,5 ml. Courbe 1 : pas d'addition de DPN. Courbe 2 : addition du DPN au temps zéro; en 1 addition de 0,3 ml d'une solution de dl acétoïne à 5 p. 100.

réaction est démontrée en suivant par spectrophotométrie à 340 m μ la formation du DPN réduit jusqu'à l'équilibre; l'addition ultérieure d'acétoïne renverse le cours de la réaction. La figure 4 exprime les résultats.

9° CALCUL DES CONSTANTES D'ÉQUILIBRE. — La réaction réalisée par la déshydrogénase s'écrit :

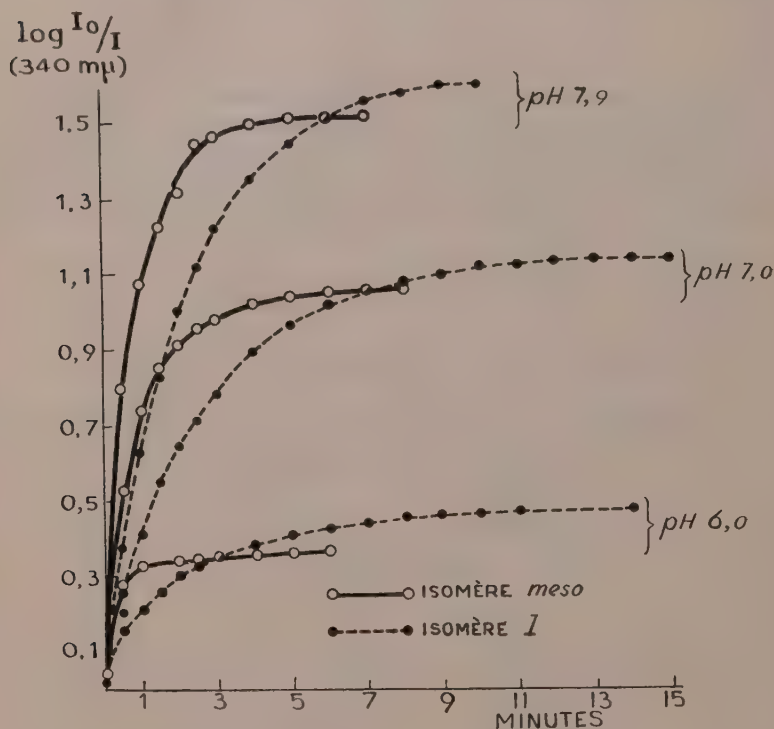


Fig. 5. — Tampon phosphate 0,02 M : 1,5 ml; 2-3 butanediol sol. à 5,0 p. 100 0,4 ml; extrait enzymatique fractionné : 0,2 ml (0,2 mg N); eau : 0,5 ml; DPN (2,3 μ mol./ml) : 0,4 ml ajoutés au temps zéro. T : 20°.

Si s représente la concentration en 2-3 butanediol à l'équilibre, s' la concentration en acétoïne, c la concentration en DPN réduit et c' la concentration en DPN oxydé, la constante d'équilibre de la réaction est : $K_e = s c' / s' c$.

Sur la figure 5, on a tracé les courbes de formation du DPN réduit à différents pH avec le *meso* et le *l* 2-3 butanediol. Les constantes d'équilibre dans les différents cas sont rapportées dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Calcul des constantes d'équilibre.

	DPN RÉDUIT (μ mol./ml)	DPN OXYDÉ (μ mol./ml)	K_e	(BUTAN.)/(ACÉT.) à l'équilibre
Isomère méso :				
pH 6,0	0,06	0,25	5 100	1 220
pH 7,0	0,19	0,12	250	396
pH 7,9	0,27	0,04	40	270
Isomère l :				
pH 6,0	0,08	0,23	2 600	1 020
pH 7,0	0,20	0,11	200	364
pH 7,9	0,28	0,03	30	280

Au départ, pour le DPN $c = 0,31 \mu$ mol./ml et pour le 2-3 butanediol $c = 74 \mu$ mol./ml.

Dans tous les cas l'équilibre est atteint plus rapidement avec l'isomère méso qu'avec l'isomère *l*, et avec l'isomère *l* cet équilibre est placé un peu plus loin dans le sens de la formation de l'acétoïne. Enfin l'équilibre se déplace dans le sens de la formation du corps oxydé quand le pH augmente.

10° ACTION DES INHIBITEURS. — Parmi les produits que nous avons étudiés, l'acide monobromacétique est le seul inhibiteur important puisque, à la concentration 0,05 M, il inhibe la réaction à 95 p. 100. L'acétoïne joue le même rôle, mais pour des raisons différentes, à cause de la réversibilité de la réaction. Le tableau V contient les résultats complets de l'étude.

TABLEAU V. — Influence de différents composés sur l'activité de la déshydrogénase.

COMPOSÉS	INHIBITION P. 100 (Concentrations en mol./l)							
	0,003	0,005	0,007	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
Acide monobromacétique. .	33		48	56	70		90	95
F Na.		2,5		6,5	11		15	
N ₃ Na.		0		0	0		0	0
Ethyluréthane		0		0	0		0	0
Arséniate de Na		0		7	16		22	23
dl acétoïne						70		

Normes habituelles. Pas d'addition d'hydroxylamine. pH 7,9. La concentration en méso 2-3 butanediol est 0,09 M, sauf dans le cas de l'addition d'acétoïne où elle est 0,03 M.

En présence de cyanure ($c = 0,02$ M) on observe une augmentation de la fixation d'oxygène. Outre que le cyanure réagit sans doute avec l'acétoïne formée, il peut jouer sur l'enzyme un rôle stimulateur déjà signalé dans d'autres cas [14].

CONCLUSION.

Par toutes ses propriétés, la 2-3 butanediol déshydrogénase s'intègre parmi les déshydrogénases connues dont le DPN est le coenzyme.

Dans l'étude plus générale de la dégradation du 2-3 butanediol par les microbes, cette déshydrogénation du substrat représente la première étape du métabolisme. Nous étudierons ultérieurement les étapes suivantes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J.-P. AUBERT. Thèse de Doctorat ès Sciences. Paris, 1950.
- [2] J.-P. AUBERT et R. GAVARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1320.
- [3] *Biochemical Preparations*. Vol. I, p. 28. John Wiley and Sons. New York, 1949.
- [4] R. D. DEMOSS, R. C. BARD et I. C. GUNSALUS. *J. Bact.*, 1951 **62**, 499.
- [5] M. HOOREMAN. *Analyt. Chim. Acta*, 1949, **3**, 606.
- [6] M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT, M. LEMOIGNE et P. DUPUY. *Ces Annales*, 1950, **78**, 512.
- [7] M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT, M. LEMOIGNE et J. MILLET. *Ces Annales*, 1950, **78**, 497.
- [8] C. H. FISKE et Y. SUBBAROW. *J. Biol. Chem.*, 1925, **66**, 375.
- [9] M. LEMOIGNE, H. GIRARD et J. JACOBELLI. *Ces Annales*, 1952, **82**, 389.
- [10] H. LINEWEAVER et D. BURK. *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 658.
- [11] A. C. NEISH. *Can. J. Res.*, 1947, **25 B**, 423.
- [12] R. Y. STANIER et S. B. FRATKIN. *Can. J. Res.*, 1944, **22 B**, 140.
- [13] F. B. STRAUB. *Biochem. J.*, 1939, **33**, 787.
- [14] F. B. STRAUB. *H. S. Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1942, **275**, 63.

INFLUENCE

DE QUELQUES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES

SUR LE PHÉNOMÈNE DE PHAGOCYTOSE

par M^{lle} S. LAMBIN et A. DESVIGNES (*).

(Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Paris.)

Il est de notion classique que différents facteurs sont susceptibles d'influencer le phénomène de phagocytose dans les conditions physiologiques normales.

Le chimiotactisme des leucocytes, première phase de la phagocytose, varie, toutes autres conditions égales, selon la température (J.C.G. Ledingham [28], celle-ci présentant un optimum variable avec l'espèce animale ayant fourni ces leucocytes (T. Madsen et O. Wulff [35], D.R. Harmon, C. Zarafonettis et P.F. Clark [22]); il est également en relation avec la pression osmotique du milieu (H.J. Hamburger [21]), avec sa teneur en glycogène (A. et M. Delaunay et L. Nicol [12]), en oxygène (J. Lebrun-Pagès et R. Robineaux [27]) ou en complément (J. Comandon [5], L. Seguin [43], K. Weinbrenner [48], A. Delaunay et J. Pagès [13], R. Robineaux [42]).

L'importance de la teneur en ions calcium du milieu signalée par H.J. Hamburger [21] puis par T. Kanai [24] a récemment été étudiée par A. Delaunay [7].

On sait aussi (S. Mielnik-Kosmiderski [36], A. Delaunay et ses collaborateurs [9, 14, 15, 16], que certains constituants polyosidiques de la cellule bactérienne et, à un moindre degré, certains nucléoprotéides, sont doués d'un net pouvoir attracteur *in vitro* à l'égard des leucocytes. Ce chimiotactisme positif se manifeste aussi expérimentalement *in vivo* pour les antigènes glucido-lipido-peptidiques, à des concentrations variant avec le degré de toxicité de ces substances [10, 11] et selon que l'on s'adresse à des animaux normaux ou préalablement immunisés [9]; certaines endotoxines des bactéries Gram négatif, identifiables aux antigènes somatiques O, joueraient ainsi dans les processus infectieux le rôle d'« agresseurs » (A. Boivin et A. Delaunay [4]) en s'opposant à l'afflux des leucocytes au niveau des foyers infectés.

D'autres constituants bactériens, tels que les exotoxines bacté-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 décembre 1952.

riennes, sont par contre pourvus d'un chimiotactisme négatif : (A. Delaunay [8], R. M. Pike [39], P. Ritossa [41]). H. Corper, M. Cohn et S. Stoner [6] ont également étudié l'action de la tuberculine et J. Dubos [17], R.H. Sia [44], D. Boari [2], C. Levaditi et J. Veillet [32] celle de certains constituants de la capsule bactérienne, doués d'une nette activité antiplagocytaire. Tout récemment, N. Choucroun, A. Delaunay, S. Bazin et R. Robineaux ont observé une inhibition du tactisme leucocytaire, sous l'influence de corps bactériens ou du lipopolyside antigénique du *Mycobacterium tuberculosis* [4 bis].

Le second stade de l'acte phagocytaire : la phase d'accolement [1, 3, 29, 30, 37, 47] précédant le stade terminal de digestion enzymatique intracellulaire [18, 38] est lui aussi soumis *in vivo* à l'influence de facteurs humoraux d'immunité qui peuvent être présents dans l'organisme et intervenir par leurs propriétés physico-chimiques et leur activité enzymatique.

D'autre part l'activité antiinfectieuse *in vivo* des médicaments chimiothérapiques actuels et celle des substances antibiotiques semble s'exercer en modifiant le métabolisme normal des bactéries, les livrant ainsi modifiées à l'action des phagocytes. Les sulfamides entraveraient la formation de toxine et celle du matériel capsulaire (C. Levaditi et A. Vaisman [31]), (V. Kollath et F. Raabe [25]), (R. Tunncliffe [46]). Les antibiotiques agiraient en modifiant la perméabilité de la cellule bactérienne (R.D. Hotchkiss [23]), en modifiant les phénomènes du métabolisme cellulaire et tout particulièrement celui des protéines et des acides nucléiques bactériens (M. Machebœuf et ses collaborateurs [19, 20]). C'est ainsi que la pénicilline provoquerait l'accumulation des monoribonucléotides, tandis que la streptomycine inhiberait la dépolymérisation enzymatique des acides nucléiques ; quant à la choromycétine, elle pourrait agir sur le bacille typhique en interférant avec le métabolisme du tryptophane (R. Truhaut, M^{lle} S. Lambin, M^{me} Boyer [45]).

Les substances antiseptiques elles-mêmes réservées au traitement externe des plaies ou tissus infectés, ont souvent à exercer leur action en présence de phagocytes.

Il nous a semblé intéressant de rechercher dans quelle mesure pouvait être modifiée l'activité des leucocytes lorsque les bactéries mises à leur contact avaient été préalablement cultivées en présence de quelques substances antiseptiques ou antibiotiques (1).

Nous avons donc cultivé quelques espèces bactériennes en bouillon peptoné salé, additionné de doses décroissantes des substances à l'étude, toutes inférieures aux doses bactériostatiques.

(1) On trouvera des détails complémentaires dans la Thèse de Doctorat en Pharmacie de A. Desvignes, Paris, 1952.

Après vingt-quatre heures d'incubation à l'étuve à 37° C., nous avons séparé les bactéries par centrifugation et les avons lavées à trois reprises au soluté physiologique de chlorure de sodium à 9 g p. 1 000. Ces bactéries, privées d'antiseptique adhérent, étaient finalement remises en suspension dans un volume de soluté physiologique tel que la concentration des *suspensions bactériennes* fut de 200 000 000 *par ml.* Le titrage de ces suspensions était effectué par mesures opacimétriques à l'électrophotomètre de Meunier ; des courbes d'étalonnage, antérieurement établies par la méthode de numération de Wright-Fries [40], nous permettaient d'évaluer les concentrations en bactéries des suspensions en fonction de leurs densités optiques.

Les suspensions leucocytaires destinées aux essais de phagocytose étaient obtenues aux dépens d'exsudats péritonéaux de cobayes recevant à trois heures d'intervalle une injection péritonéale de 6 puis 4 cm³ de bouillon peptoné stérile ; deux heures après la dernière injection, nous déterminions la teneur en leucocytes polynucléaires des exsudats péritonéaux (2). Nous avons ainsi pu constater que celle-ci variait selon les animaux (l'écart atteignant 30 p. 100 environ (de 19 400 à 27 000 par millimètre cube pour six cobayes mis en expérience), et qu'il y avait intérêt à utiliser ces exsudats dès leur prélèvement afin d'éviter la baisse rapide de leur titre en leucocytes (baisse atteignant environ 30 p. 100 après une demi-heure de repos), par suite de l'adhésion de ceux-ci aux parois des récipients. Nous avons obtenu des exsudats de titre relativement fixe (variant seulement de 22 000 à 24 200 par millimètre cube, en adoptant pour nos essais des mélanges d'exsudats fournis par trois animaux et utilisés dès leur prélèvement.

Les essais de phagocytose ont été réalisés comme suit :

Dans des tubes à hémolyse préalablement réchauffés par séjour d'une heure à 37° C., étaient mélangés 0,5 cm³ de suspension bactérienne et 0,5 cm³ de suspension leucocytaire ; après une demi-heure d'incubation à l'étuve à 37° C., le sédiment déposé au fond du tube à hémolyse était étalé sur une lame de verre, fixé après dessiccation et coloré au bleu de méthylène acétique dans le cas du staphylocoque, à la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 dans le cas des autres bactéries ; nous avons alors établi, sur plusieurs centaines de leucocytes, les différentes valeurs de l'« *index phagocytaire* », c'est-à-dire du nombre moyen de bactéries englobées par leucocyte.

RÉSULTATS OBTENUS.

I. PHAGOCYTOSE DE BACTÉRIES CULTIVÉES EN PRÉSENCE DE SUBSTANCES ANTISEPTIQUES : IODE, PHÉNOL, BICHLORURE DE MERCURE. — *Les*

(2) Nous tenons à remercier ici le Dr Delaunay de nous avoir familiarisés avec l'utilisation de cette technique.

concentrations bactériostatiques des substances antiseptiques mises en expérience ont, tout d'abord été déterminées par la méthode des dilutions (S. Lambin [26]) vis-à-vis des souches bactériennes mises en expérience : *Staphylococcus aureus* (souche Oxford), *Klebsiella pneumoniae* (souche + Fac. Ph^{ie}), *Escherichia coli* (souche S. Fac. Ph^{ie}), *Pseudomonas aeruginosa* (souche Gessard).

Le milieu d'essai était le bouillon peptoné salé utilisé pour les cultures ultérieures ; la concentration bactérienne utilisée était de 10 000 000 par centimètre cube. La durée d'incubation de vingt-quatre heures à la température de + 37° C. La lecture des résultats était effectuée macroscopiquement d'après la dilution limite inhibant le développement des cultures. La dose bactériostatique représente en grammes pour 1 000 centimètres cubes ou en milligrammes par centimètre cube la valeur moyenne entre la plus forte concentration inefficace et la plus faible concentration bactériostatique. Nous avons ainsi obtenu les doses bactériostatiques indiquées dans le tableau I.

TABLEAU I.

	DOSES BACTÉRIOSTATIQUES (g pour 1 000 ml)		
	Iode	Phénol	Chlorure mercurique
<i>Staphyloc. aureus</i>	0,32	2,12	0,003
<i>Esch. coli</i>	0,52	1,75	0,004
<i>Ps. aeruginosa</i>	0,32	1,10	0,002
<i>Klebs. pneumoniae</i>	0,30	1,10	0,002

Les essais de phagocytose des bactéries cultivées en présence de quantités croissantes de chacune de ces substances et, nécessairement, inférieures à leur dose bactériostatique, ont donné les résultats réunis dans le tableau II.

Ces résultats confirment le fait, connu, que des bactéries normales mais appartenant à des espèces différentes, présentent une aptitude plus ou moins marquée à la phagocytose comme le montrent les valeurs des index phagocytaires respectivement obtenus pour les cultures témoins réalisées en l'absence d'antiseptiques (v. tableaux II et III).

Nous constatons, d'autre part, que des bactéries appartenant à une même espèce, cultivées en présence de concentrations croissantes d'iode, de phénol ou de chlorure mercurique, deviennent d'autant plus phagocytibles qu'elles se sont multipliées en présence d'une plus forte concentration de la substance, compatible avec leur multiplication. Les valeurs maximum obtenues pour les index

TABLEAU II (1).

CONCENTRATIONS croissantes	INDEX PHAGOCYTAIRE DES BACTÉRIES CULTIVÉES en présence de :			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>d'iode</i> (g p. 1 000 ml) :				
0 (témoin)	4,6	0,46	0,30	0,32
0,01	5,26		0,25	0,26
0,05	6,38	0,85	0,30	0,58
0,10	8,18		0,16	0,83
0,15		0,82		
0,20	9,8		0,24	1,05
0,30		1		
<i>de phénol</i> (g p. 1 000 ml) :				
0 (témoin)	4,6	0,46	0,30	0,32
0,01	6	1,18	0,20	0,74
0,05	7,6	1,24	0,32	0,94
0,10	8,1	1,40	0,23	1,34
0,50	9,9	1,28	1,16	1,16
1	12,5			
<i>de Cl²Hg</i> (mg p. 1 000 ml) :				
0 (témoin)	4,6	0,46	0,30	0,32
0,01	5,6			
0,05	6,45	0,5	0,21	1,5
0,10	8	0,85	0,32	2,25
0,50	9	0,80	0,29	2,90
1		1,20	0,40	

(1) Les valeurs maximum obtenues sont imprimées en caractères gras.

TABLEAU III.

	TÉMOIN	INDEX PHAGOCYTAIRES MAXIMUM des bactéries cultivées en présence de :		
		Iode	Phénol	Chlorure mercurique
<i>Staphyloc. aureus</i>	4,6	9,8	12,5	9
<i>Esch. coli</i>	0,46	1	1,4	1,2
<i>Ps. aeruginosa</i>	0,32	1,05	1,34	2,9
<i>Klebs. pneumoniae</i>	0,30	0,30	1,16	0,4

phagocytaires traduisent une activité généralement deux à trois fois plus intense du phénomène de phagocytose lorsque celui-ci

s'exerce sur des bactéries développées en présence de la concentration optimale des substances antiseptiques. — Le bacille pyocyanique voit son index phagocytaire multiplié par 9 lorsqu'il est cultivé en présence de chlorure mercurique à la concentration de 500 μg pour 1 000 cm^3 de bouillon. Seul le pneumobacille de Friedländer s'est montré assez indifférent à la présence d'iode et de chlorure mercurique dans le milieu de culture et à celle du phénol aux faibles concentrations.

II. PHAGOCYTOSE DE BACTÉRIES CULTIVÉES EN PRÉSENCE DE PÉNICILLINE OU DE STREPTOMYCINE. — Les doses bactériostatiques de ces substances à l'égard de nos souches bactériennes ont été déterminées par la méthode des dilutions, dans les conditions ci-dessus indiquées pour les substances antiseptiques, mais après vingt heures d'incubation seulement. Elles ont été les suivantes (tableau IV) :

TABLEAU IV.

	DOSES BACTÉRIOSTATIQUES		
	Pénicilline		Streptomycine en μg par ml
	en U.O. par ml	en μg par ml	
<i>Staphyloc. aureus</i>	0,05	0,03	15
<i>Esch. coli</i>	60	36	25
<i>Ps. aeruginosa</i>	10 000	6 000	15
<i>Klebs. pneumoniae</i>	8	4,8	2

Des cultures de ces diverses bactéries ont ensuite été effectuées, en présence des concentrations subbactériostatiques en antibiotiques, indiquées dans le tableau V ; puis les *index phagocytaires* des bactéries développées en présence de diverses concentrations mises en expériences ont été déterminés, comme il a été dit plus haut ; les valeurs de ces index phagocytaires sont reportées dans le tableau V :

L'examen de ces résultats montre que le phénomène de phagocytose subit *in vitro* une augmentation sensible et régulière lorsqu'il s'exerce sur des bactéries cultivées en présence de doses croissantes de pénicilline ou de streptomycine. L'activité phagocytaire devient deux à trois fois plus intense qu'elle ne l'est à l'égard de bactéries témoins, comme le montrent les valeurs maximum obtenues pour l'index phagocytaire (tableau VI).

Il convient de remarquer que le phénomène de phagocytose s'est trouvé influencé dans le même sens pour des espèces bactériennes

TABLEAU V.

Index phagocytaires de bactéries cultivées en présence de pénicilline
(concentrations exprimées en Unités Oxford par ml)

ESPECES bactériennes							
<i>Staphylococcus aureus</i>	CONCENTRATIONS EN PÉNICILLINE . . .	0	0,001	0,002	0,01	0,04	
	Index phagocytaires	4,6	4,98	4,64	6,8	9,1	
	Leucocytes actifs en p. 100	80	82	80	75	85	
<i>Escherichia coli</i>	CONCENTRATIONS EN PÉNICILLINE . . .	0	1	4	10	20	40
	Index phagocytaires	0,46	0,78	0,75	1,10	1,45	1,10
	Leucocytes actifs en p. 100	24	22	19	15	18	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CONCENTRATIONS EN PÉNICILLINE . . .	0	200	1,000	2,000		
	Index phagocytaires	0,32	0,44	0,56	0,96		
	Leucocytes actifs en p. 100	22	16	18	12		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CONCENTRATIONS EN PÉNICILLINE . . .	0	0,1	0,2	1		
	Index phagocytaires	0,3	0,4	0,36	0,64		
	Leucocytes actifs en p. 100	18	18	20	15		

Index phagocytaires de bactéries cultivées en présence de Streptomycine
(concentrations exprimées en µg par ml).

ESPECES bactériennes							
<i>Staphylococcus aureus</i>	CONCENTRATIONS EN STREPTOMYCINE .	0	0,2	1	2	5	
	Index phagocytaires	4,6	5,8	10,3	9,9	11,5	
	Leucocytes actifs en p. 100	80	84	82	78	85	
<i>Escherichia coli</i>	CONCENTRATIONS EN STREPTOMYCINE .	0	0,4	2	4	10	
	Index phagocytaires	0,46	0,76	0,84	1	0,65	
	Leucocytes actifs en p. 100	24	22	24	18	13	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CONCENTRATIONS EN STREPTOMYCINE .	0	0,4	2	4	10	
	Index phagocytaires	0,32	0,40	0,36	1,10	0,82	
	Leucocytes actifs en p. 100	22	16	18	12	13	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CONCENTRATIONS EN STREPTOMYCINE .	0	0,04	0,08	0,32	0,8	
	Index phagocytaires	0,30	0,50	0,54	0,36	0,70	
	Leucocytes actifs en p. 100	18	13	12	11	15	

TABLEAU VI.

	VALEURS MAXIMUM de l'index phagocytaire de bactéries		
	Témoins	Cultivées en présence de :	
		Pénicilline	Streptomycine
<i>Staphyloc. aureus</i>	4,6	9,1	11,56
<i>Esch. coli</i>	0,46	1,45	1,06
<i>Ps. aeruginosa</i>	0,32	0,96	1,10
<i>Klebs. pneumoniae</i>	0,30	0,64	0,70

très sensibles ou peu sensibles à l'action bactériostatique des substances antibiotiques. La concentration favorisant au mieux la phagocytose est généralement très voisine de la concentration bactériostatique ; c'est seulement pour *Esch. coli* et *Ps. aeruginosa* qu'elle ne correspond pas à la plus forte concentration d'antibiotique réalisée dans le milieu de culture. Peut-être ce fait est-il en rapport avec l'altération morphologique de ces germes qui, lorsqu'ils ont acquis des tailles anormalement longues, se retrouvent rarement inclus dans les polynucléaires.

Le pneumobacille s'est comporté dans ces essais de façon un peu particulière ; sa capsule était altérée, puis disparaissait, lorsque ce germe était cultivé en présence d'une concentration de streptomycine de 0,08 µg par centimètre cube, donc très inférieure à la concentration bactériostatique, et cependant, cette perte de substance capsulaire ne semble pas avoir nettement favorisé la phagocytose de cette bactérie.

Nos essais étaient terminés lorsque nous eûmes connaissance des recherches de A. Linz et E. Lecocq [33, 34] entreprises dans un but sensiblement identique au nôtre. Toutefois les conditions expérimentales adoptées par ces auteurs dans leurs premières séries d'essais [33] différaient notablement des nôtres sur deux points : tout d'abord les substances antibiotiques étaient placées au contact direct du mélange de leucocytes et de bactéries ; d'autre part elles étaient utilisées à concentrations bactériostatiques. C'est donc en présence même de quantités bactériostatiques que s'effectuait le phénomène de phagocytose. Par la suite [34], les auteurs modifièrent leurs conditions expérimentales et procédèrent à une imprégnation des bactéries pendant quelques heures avec de fortes concentrations d'antibiotiques avant de les débarrasser par lavages, des substances antibiotiques, et de les soumettre à la phagocytose, se rapprochant ainsi nettement de nos conditions expérimentales. Il est particulièrement intéressant de noter que

nos essais, bien qu'effectués dans des conditions différentes, nous ont conduits à des conclusions sensiblement concordantes.

Envisageant la question d'un autre point de vue, nous avons déterminé à côté des index phagocytaires des bactéries cultivées en présence de faibles concentrations de substances bactériostatiques, le *pourcentage des leucocytes doués de pouvoir phagocytaire* à l'égard de ces bactéries. Le protocole des essais a été le même que celui précédemment utilisé. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau V avec les index phagocytaires correspondants.

Si nous considérons *diverses espèces bactériennes* dont les index phagocytaires sont très différents, nous constatons de nettes divergences dans le pourcentage des leucocytes actifs à l'égard des bactéries témoins ; ce pourcentage varie de 80 p. 100 pour *Staphylococcus aureus*, à 24 p. 100 pour *Escherichia coli*, 22 p. 100 pour *Pseudomonas aeruginosa* et 18 p. 100 pour *Klebsiella pneumoniae*. Nous retrouvons ici une progression parallèle à celle des index phagocytaires de ces bactéries qui sont respectivement de 4,6, 0,46, 0,32 et 0,30 ; cette observation confirme l'existence notée par H.J. Hamburger [21] d'une relation entre les valeurs de l'index phagocytaire et du pourcentage de leucocytes actifs.

Mais pour *une même espèce bactérienne*, si nous recherchons les variations de ce pourcentage leucocytaire en fonction des concentrations de substance antibactérienne auxquelles ont été soumis les germes avant les essais de phagocytose, nous ne trouvons que des variations peu accusées et irrégulières ; la recherche de l'index phagocytaire nous paraît donc plus adéquate lorsqu'il s'agit de mettre en évidence de faibles variations d'intensité du phénomène de phagocytose.

CONCLUSION.

Certaines bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) lorsqu'elles se multiplient en présence de concentrations subbactériostatiques de substances antiseptiques (iode, phénol, chlorure mercurique) ou antibiotiques (pénicilline, streptomycine) acquièrent une aptitude deux à trois fois plus marquée à la phagocytose, que des bactéries de la même espèce normalement cultivées. La concentration optimale favorisant la phagocytose est généralement très voisine de la dose bactériostatique.

Il ne semble pas exister de ce point de vue, de différences essentielles entre l'activité des substances antibiotiques et celle des substances antiseptiques étudiées.

D'autre part, cette augmentation de la susceptibilité à la phagocytose semble être sans relation avec la sensibilité à la pénicilline ou à la streptomycine de l'espèce considérée.

Enfin le fait que cette augmentation de sensibilité à la phagocytose a été observé avec des bactéries privées par lavage des très faibles quantités de substances antibactériennes au contact desquelles elles s'étaient développées, semble indiquer que l'action favorisante de ces substances à l'égard de la phagocytose s'est exercée sur les bactéries elles-mêmes et non pas sur les leucocytes mis en leur présence.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABRAMSON. *J. exp. Med.*, 1927, **46**, 987 et 1003.
- [2] D. BOARI. *Giorn. Batt. e. Immunol.*, 1938, **20**, 1 (d'après *Bull. Inst. Pasteur*, 1938, **36**, 692).
- [3] A. BOIVIN et A. DELAUNAY. *Phagocytose et infection*, Hermann, éd., Paris, 1947.
- [4] A. BOIVIN et A. DELAUNAY. *Bull. Acad. Med.*, 1943, **127**, 274.
- [4 bis] N. CHOUCROUN, A. DELAUNAY, S. BAZIN et R. ROBINEAUX. *Ces Annales*, 1951, **80**, 619.
- [5] J. COMANDON. *Ces Annales*, 1920, **34**, 1.
- [6] H. CORPER, M. COHN et R. STONER. *Am. Rev. Tub.*, 1945, **51**, 566.
- [7] A. DELAUNAY. *Ces Annales*, 1944, **70**, 372.
- [8] A. DELAUNAY. *Rev. Immunol.*, 1943, **8**, 30.
- [9] A. DELAUNAY. *Rev. Immunol.*, 1942, **7**, 33.
- [10] A. DELAUNAY et Y. LEHOULT. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 387.
- [11] A. et M. DELAUNAY et Y. LEHOULT. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 259.
- [12] A. et M. DELAUNAY et L. NICOL. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 192.
- [13] A. DELAUNAY et J. PAGÈS. *Rev. Immunol.*, 1946, **10**, 33 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 557 ; *Ces Annales*, 1946, **72**, 458 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 933.
- [14] A. DELAUNAY et R. SARCIRON. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 368.
- [15] A. DELAUNAY, R. SARCIRON et J. PAGÈS. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1529.
- [16] A. DELAUNAY, R. SARCIRON, R. VENDRELY et Y. LEHOULT. *Rev. Immunol.*, 1942, **7**, 134.
- [17] J. DUBOS. *The bacterial cell*. Harvard University Press, 1949.
- [18] D. GROB. *J. Gen. Physiol.*, 1949, **33**, 103.
- [19] F. GROS, M. MACHEBOEUF, U. RAMBECH et C. LATERRADE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 127.
- [20] F. GROS, M. MACHEBOEUF, B. RYBAK et P. LACAILLE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 246.
- [21] H. J. HAMBURGER. *Physikalisch-Chemische Untersuchungen über Phagocyten*, Wiesbaden, 1912.
- [22] D. R. HARMON, C. ZARAFONETTIS et P. F. CLARK. *J. Bact.*, 1946, **51**, 626 ; 1946, **52**, 387, et 1947, **53**, 343.
- [23] R. D. HOTCHKISS. *Adv. Enzymol.*, 1944, **4**, 153.
- [24] T. KANAI. *Pflüger's Arch.*, 1923, **168**, 401.
- [25] W. KOLLATH et F. RAABE. *Centralbl. Bakt.*, 1943, **149**, 434.
- [26] S. LAMBIN. Thèse Doct. ès sciences. Masson, éd., Paris, 1933.
- [27] J. LEBRUN-PAGÈS et R. ROBINEAUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 416.
- [28] J. C. G. LEDINGHAM. *Proceed. Roy. Soc. Series B*, 1908, **80**, 188.
- [29] M. LE FÈVRE DE ARRIC. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 968.

- [30] C. LEVADITI. *C. R. Soc. Biol.*, 1918, **81**, 1064.
- [31] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 463.
- [32] C. LEVADITI et J. VEILLET. *Rev. Immunol.*, 1947, **11**, 206.
- [33] A. LINZ et E. LECOCQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 1247 et 1250 ; 1951, **145**, 1402, et 1952, **146**, 292.
- [34] A. LINZ et E. LECOCQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 1405.
- [35] T. MADSEN et O. WULFF. *Ces Annales*, 1919, **33**, 437.
- [36] S. MIELNIK-KOSMIDERSKI. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1939, **95**, 238.
- [37] S. MUDD. *J. Immunol.*, 1934, **26**, 447.
- [38] E. L. OPIE. *Physiol. Rev.*, 1922, **2**, 552.
- [39] M. PIKE. *J. Immunol.*, 1934, **26**, 69.
- [40] J. REGNIER et coll. *Bull. Sci. Pharmacol.*, 1927, **34**, 40 et 1934, **41**, 152, 231 et 291.
- [41] P. RITOSSA. *Pediatrics*, 1937, **45**, 1 (d'après *Bull. Inst. Pasteur*, 1937, **35**, 1046).
- [42] R. ROBINEAUX. *Semaine des Hôpitaux*, Paris, 14 mars 1951, 848.
- [43] L. SEGUIN. *Thèse Pharmacie*, Paris, 1926.
- [44] R. H. P. SLA. *J. exp. Med.*, 1926, **43**, 633.
- [45] R. TRUHAUT, M^{lle} S. LAMBIN et M^{me} BOYER. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 387.
- [46] R. TUNNICLIFF. *J. Infect. Dis.*, 1939, **64**, 59.
- [47] WEDEN. *Arch. J. exp. Path. u. Pharmacol.*, 1933, **172**, 161.
- [48] K. WEINBRENNER. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1934, **83**, 437.

COMPARAISON DE SOUCHES BACTÉRIENNES RÉSISTANTES A DES ANTIBIOTIQUES AVEC DES SOUCHES SENSIBLES DE MÊME ESPÈCE ⁽¹⁾

par MIRKO BELJANSKI.

(Institut Pasteur. Service du professeur MACHEBOEUF.)

III. — Cas du sulfamide (1162 F).

Dans nos travaux antérieurs [1, 2] nous avons démontré des différences biochimiques très nettes entre des souches bactériennes sensibles et des souches de même espèce résistant à la streptomycine ou à la pénicilline. Nous nous sommes demandé si des différences semblables se manifestaient lorsque l'on étudiait une souche résistant au para-àmino-phényl-sulfamide.

Une souche de *Staphylococcus aureus* (Oxford) résistant à 155 mg de chlorhydrate de para-àmino-phényl-sulfamide (1162 F) pour 100 ml de milieu de culture a été obtenue par la technique indiquée dans le cas de la streptomycino-résistance en utilisant le bouillon nutritif glucosé comme milieu de culture, car le milieu peptoné n'est pas favorable [3, 4, 5].

La prolifération de la souche sensible est inhibée par 13 mg de sulfamide (1162 F) pour 100 ml du même milieu de culture.

CROISSANCE D'UNE SOUCHE SENSIBLE ET D'UNE SOUCHE RÉSISTANTE AU SULFAMIDE (1162 F).

Nous avons comparé la prolifération des deux souches et les résultats sont exprimés par les courbes de la figure 1. Les courbes montrent que la phase de latence de la souche résistante est plus longue que celle de la souche sensible. La phase exponentielle de croissance ne diffère pas pour les deux souches et le rendement est le même. (Nous confirmons ici les résultats

(1) Un résumé de ce travail a été publié [7].

obtenus par Steers et Sevag [6].) Le retard dans la phase de latence d'une souche résistante que nous avons déjà observé [1, 2] se retrouve donc dans le cas d'une souche sulfamido-résistante.

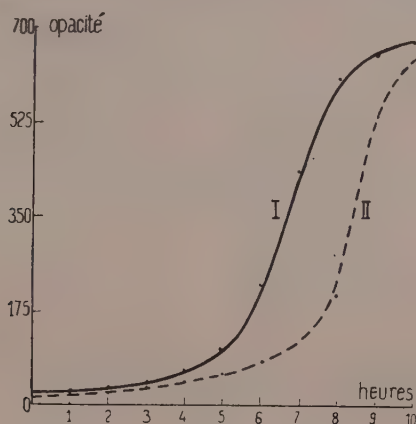


FIG. 1. — Courbe de croissance de *Staphylococcus aureus*.
I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

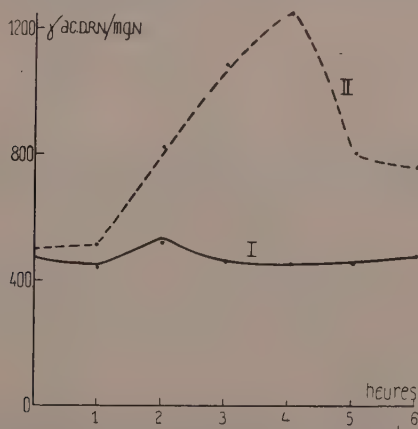


FIG. 2. — Teneur en acide désoxyribonucléique de *Staphylococcus aureus*.
I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

ETUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES CHEZ *Staphylococcus aureus* SENSIBLE ET RÉSISTANT AU SULFAMIDE (1162 F).

Comme dans le cas des antibiotiques étudiés [1] nous avons porté notre attention sur le métabolisme des acides nucléiques.

Le phénomène observé pour la streptomycine et la pénicilline en ce qui concerne l'accumulation de l'acide ribonucléique chez les souches résistantes ne se retrouve pas chez les bactéries sulfamido-résistantes. Au lieu d'accumuler des quantités importantes d'acide ribonucléique, la souche de *Staphylococcus aureus* sulfamido-résistante n'accumule pratiquement pas plus d'acide ribonucléique que la souche sensible, mais au contraire, elle accumule deux fois plus d'acide désoxyribonucléique (fig. 2).

Nos résultats sont exprimés en μg de l'acide désoxyribonucléique par rapport au milligramme d'azote total microbien.

L'opposition est très marquée avec les faits observés pour les

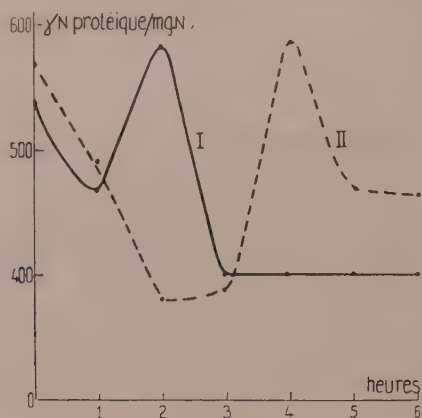


FIG. 3. — Teneur en azote protéique de *Staphylococcus aureus*.
I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

souches résistant à la pénicilline et à la streptomycine que nous avons étudiées. Ces faits nous paraissent dignes d'études détaillées que nous nous proposons d'entreprendre ultérieurement.

MÉTABOLISME DES PROTÉINES, DES IONS ORTHOPHOSPHORIQUES ET DES MONONUCLÉOTIDES PURIFIÉS CHEZ *Staphylococcus aureus* SENSIBLE ET RÉSISTANT AU SULFAMIDE (1162 F).

Pour divers constituants de la cellule microbienne : protéines, ions orthophosphates acido-solubles, mononucléotides purifiés, nous ne trouvons pas de différences quantitatives entre les deux souches, sensible et résistante (fig. 3, 4, 5).

Cependant, Steers et Sevag [6] ont observé que leur souche résistante aux sulfamides perdait partiellement ou complètement le pouvoir de synthétiser les acides aminés. Une souche résis-

tante de *Staphylococcus aureus* est incapable de synthétiser par exemple l'acide aspartique. Mais l'utilisation par la souche sulfamido-résistante des acides aminés préformés est relativement

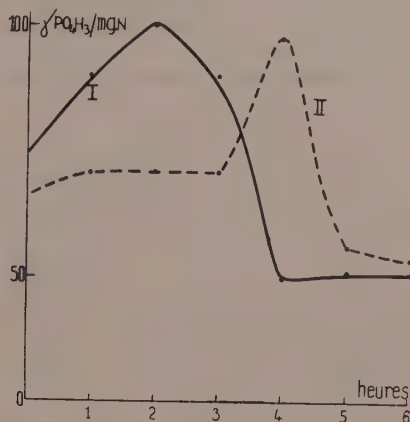


FIG. 4. — Ions orthophosphoriques de *Staphylococcus aureus*.
I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

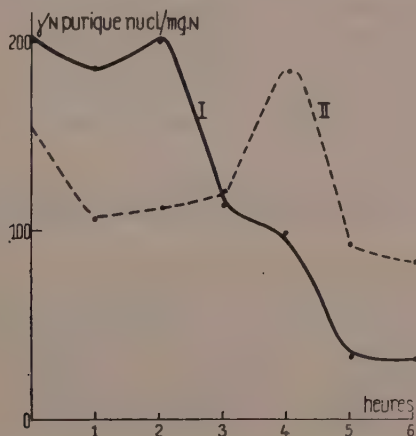


FIG 5. — Teneur en azote purique nucléotidique de *Staphylococcus aureus*.
I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

intense. C'est seulement la synthèse de certains acides aminés qui est modifiée.

Nous n'avons pas étudié la synthèse des acides aminés chez *Staphylococcus aureus* sulfamido-résistant, mais seulement la formation des protéines. Nos études montrent qu'il n'existe pas

de différence en ce qui concerne le taux des protéines entre les deux souches sensible et résistante au chlorhydrate de *p*-amino-phényl-sulfamide.

Dans nos expériences, il est vrai, les bactéries avaient à leur disposition tous les amino-acides nécessaires : elles n'avaient pas à dépendre de leur synthèse.

Nos résultats ne sont donc pas en désaccord avec ceux de Steers et Sevag.

CONCLUSION.

Une souche de *Staphylococcus aureus* résistant au para-amino-phényl-sulfamide est comparée avec la souche sensible dont elle dérive. Si l'on cultive ces deux souches dans des conditions identiques, la souche résistante présente une phase de latence un peu plus longue et elle accumule deux fois plus d'acide désoxyribonucléique que la souche sensible. (Les souches streptomycino- et pénicillino-résistantes étudiées antérieurement n'accumulent pas d'acide désoxyribonucléique, mais de l'acide ribonucléique).

IV. — Cas de l'azoture de Na (N_3Na).

De nombreux travaux ont été faits pour expliquer le mécanisme d'action de l'azoture de sodium chez *Escherichia coli*. L'action de cette substance antibiotique sur le métabolisme d'un mutant d'*Escherichia coli* (mutant azido-résistant) a été étudiée par Grunberg-Manago [8]. Cette étude ne porte pas sur le métabolisme des acides nucléiques et des protéines, mais sur l'utilisation du glucose en aérobiose et anaérobiose en présence ou en absence d'azoture de sodium.

Notre attention s'est surtout portée sur le métabolisme des acides nucléiques de souches d'*Escherichia coli*, sensible et résistante à N_3Na .

La souche résistante que nous avons utilisée (2) se développe bien en présence d'azoture de sodium $\frac{M}{100}$. La souche sensible dont provient la souche résistante ne prolifère pas avec une concentration de $\frac{M}{700}$ en azoture de sodium.

ETUDE DE LA CROISSANCE D'*Escherichia coli* SENSIBLE ET RÉSISTANT A L' N_3Na .

Pour étudier la courbe de croissance de ces souches nous avons utilisé le milieu gélosé dans des boîtes de Roux. Deux séries de

2 La souche d'*Escherichia coli* (Monod) résistant à l' N_3Na a été mise à notre disposition par M^{me} Grunberg-Manago, que nous remercions très vivement.

boîtes furent ensemencées avec des inocula égaux (10 ml de la culture respective prélevée à la dix-huitième heure de la croissance). Les boîtes sont portées à 37°.

A chaque heure on récolte les bactéries d'une boîte avec le maximum de précautions en lavant bien la surface du milieu gélosé avec de l'eau distillée en utilisant les billes de verre. Les bactéries sont lavées et mises en suspension dans 4,5 ml d'eau distillée. Pour la mesure de l'opacité on prélève 0,5 ml de la suspension bactérienne, on y ajoute 4,5 ml d'eau distillée et deux gouttes de formol. Les lectures sont faites à l'électrophotomètre de Meunier (écran orange).

Nos résultats sont exprimés par les courbes de la figure 6.

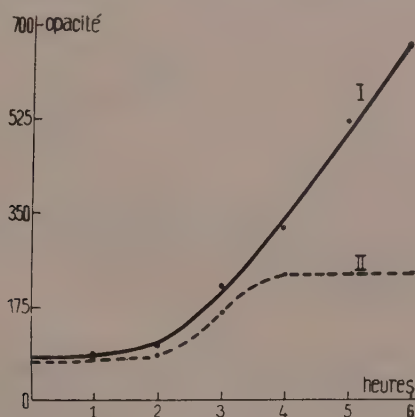


FIG. 6. — Croissance d'*Escherichia coli*.
I, Souche azido-sensible; II, Souche azido-résistante.

Nos courbes de croissance sur milieu solide confirment celles obtenues par Grunberg-Manago. On voit nettement, d'une part, qu'il y a un retard de la croissance pour la souche résistante à l'azoture de sodium et, d'autre part, que la croissance de cette souche atteint un rendement beaucoup moins élevé (dans les premières heures de la croissance) que pour la souche sensible.

ETUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES, DE LEURS DÉRIVÉS ET DES PROTÉINES CHEZ *Escherichia coli* SENSIBLE ET RÉSISTANT A L' N_3Na .

La souche résistante fut cultivée sur milieu liquide ou solide en absence d'azoture de sodium. Elle garda sa résistance après de nombreux passages [8].

En ce qui concerne le métabolisme des acides nucléiques et

de leurs dérivés, nous retrouvons un phénomène analogue à celui observé dans le cas de la streptomycino-résistance et de la pénicillino-résistance [1, 2] : la souche azido-résistante accumule de l'acide ribonucléique en plus grande quantité que la souche sensible, mais cette accumulation est moins importante que dans le cas des souches, pénicillino-résistante ou streptomycino-résistante, que nous avons étudiées.

Nos résultats sont exprimés en μg de ribose de l'acide ribonucléique par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 7).

Pour les autres constituants des bactéries : acide désoxyribo-

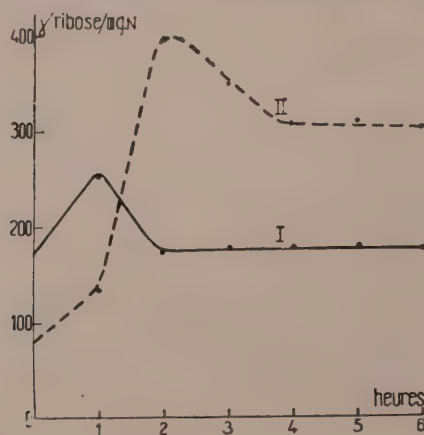


Fig. 7. — Teneur en ribose de l'acide ribonucléique d'*Escherichia coli*.
I, Souche azido-sensible; II, Souche azido-résistante.

nucléique, mononucléotides puriques, ions orthophosphoriques et les protéines, nous ne constatons pratiquement pas de différence entre la souche sensible et la souche résistante.

DISCUSSION.

Chaque fois que nous avons comparé pendant leur prolifération, une souche résistante à une souche normale de même espèce, nous avons constaté que la souche résistante accumule, au début de sa croissance active (début de la phase exponentielle de croissance), une proportion beaucoup plus grande d'un certain type d'acide nucléique. D'autre part, nous avons constaté que les souches résistantes que nous avons étudiées présentent une période de latence notablement plus longue que celle des souches sensibles [1, 2].

On peut se demander si le retard dans la synthèse de l'acide

ribonucléique a comme conséquence un retard dans le démarrage de la division cellulaire, ou bien si, au contraire, c'est le retard de démarrage de la division qui est la cause première.

Il est encore difficile de donner une explication satisfaisante à ces faits expérimentaux.

D'après les travaux de Brachet [9] et de Caspersson [10], ceux de Malmgren et Heden [11], le taux de la division cellulaire et de la synthèse protéique serait directement proportionnel à la quantité d'acides nucléiques. Ce rapport n'est pas respecté dans les souches résistantes que nous avons étudiées jusqu'à présent. Elles accumulent notablement plus d'acide ribonucléique et pourtant le taux de la division cellulaire est inférieur à celui des souches sensibles. Ceci nous conduit à penser que le catabolisme des acides nucléiques est ralenti dans les souches résistantes. Si, pour la souche streptomycino-résistante de *Staphylococcus aureus* (Oxford), on ajoute dans le milieu de culture de la cocarboxylase (antagoniste de la streptomycine [12]), le catabolisme des acides nucléiques est notablement activé et le taux de la division cellulaire augmente sans qu'il en soit de même pour les protéines [13].

D'après nos résultats, il semble que chez une souche résistant à un antibiotique la vitesse de la division cellulaire ne dépende pas uniquement de la quantité d'acide ribonucléique. D'autres facteurs y seraient nécessaires pour augmenter la vitesse de la division cellulaire.

Des résultats inédits (3), obtenus pour une souche de *Staphylococcus aureus* n° 133 streptomycino-résistante et pour une souche de *Salmonella enteritidis* (var. Danysz) streptomycino-résistante, nous conduisent à penser que l'anabolisme de l'acide ribonucléique chez ces deux souches résistantes est plus actif que celui des souches sensibles. Cette explication trouve appui dans le fait que les souches n° 133 et *Salmonella enteritidis* streptomycino-résistantes possèdent pratiquement le même taux de croissance que les souches sensibles, et pourtant elles accumulent notablement plus d'acide ribonucléique que les souches sensibles.

La corrélation qui existe, d'après Brachet et Caspersson, entre la quantité d'acide ribonucléique et la synthèse protéique ne s'observe donc pas quand on compare des souches résistant aux antibiotiques à des souches sensibles de mêmes espèces. C'est seulement dans le cas de la souche pénicillino-résistante que nous avons étudiée, que nous constatons des variations de même sens pour l'accumulation des protéines et l'accumulation des acides nucléiques. Et même, dans ce cas, il n'y a qu'un parallélisme très grossier.

(3) Résultats inédits de M. Beljanski.

Pour chacun des antibiotiques nous avons comparé une population résistante à la population originelle sensible de même espèce. Il serait très intéressant de comparer plusieurs mutants distincts résistants avec plusieurs mutants sensibles afin de pouvoir affirmer que les différences que nous notons entre populations résistantes et populations sensibles sont réellement liées indissolublement à la résistance.

CONCLUSIONS.

I. La phase de latence de la souche azido-résistante est plus longue que celle de la souche sensible. Le rendement de la souche résistante est inférieur à celui de la souche sensible pendant les premières heures de la croissance, mais s'élève finalement à une même valeur.

II. La souche azido-résistante accumule davantage d'acide ribonucléique que la souche sensible. Pour les autres constituants des bactéries nous n'avons pas trouvé de différence quantitative.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BELJANSKI. *Ces Annales*, 1952, **83**, 80.
- [2] M. BELJANSKI. *Ces Annales*, 1953, **84**, 402.
- [3] A. LWOFF, F. NITTI et M^{me} J. TRÉFOUËL. *Ces Annales*, 1941, **67**, 173.
- [4] F. NITTI et J. TABONE. *Ces Annales*, 1942, **68**, 360.
- [5] J. TABONE, F. NITTI et H. MOUSSET. *Ces Annales*, 1944, **70**, 366.
- [6] E. STEERS et G. SEVAG. *Arch. Bioch.*, 1949, **24**, 129 et 144.
- [7] M. BELJANSKI. *Ann. Biol.*, 1951, **27**, 775.
- [8] M. GRUNBERG-MANAGO. *Ces Annales*, 1950, **79**, 77.
- [9] J. BRACHET. *Actualités biochimiques*, 1951, p. 1..
- [10] T. CASPERSSON. *Symposium Soc. exp. Biol. Nucleic Acids*, 1947.
- [11] H. MALMGREN et HEDEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1947, **24**, 417 et 448.
- [12] M. FAGUET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 532.
- [13] M. BELJANSKI. II^e Congrès Int. de Biochimie, Paris, 1952.

**QUELQUES CONDITIONS
D'APPARITION ET DE NON-APPARITION
DU PHÉNOMÈNE HÉMORRAGIQUE
DE SANARELLI-SHWARTZMAN**

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

par A. ALECHINSKY.

(Laboratoire de Bactériologie de l'Université de Bruxelles.)

Dans notre mémoire précédent [1] nous avons exposé les facteurs qui favorisent ou qui inhibent l'apparition du phénomène hémorragique de Sanarelli et de Schwartzman, et ceci sans nous écarter des principes qui président à ce phénomène hémorragique.

En effet, on a vu que lorsque l'animal d'expérience, le lapin, reçoit simultanément deux injections préparantes de filtrat microbien, l'une dans la peau et l'autre dans la veine, la réaction hémorragique, qui logiquement aurait dû se manifester après injection du filtrat déchainant, n'apparaît ni à la peau, ni dans les viscères.

Or, comme nous l'avons montré, il suffit d'ajouter au filtrat un peu d'extrait testiculaire ou simplement un peu de sérum de cheval, de blanc d'œuf ou de lait de vache, pour que la réaction hémorragique apparaisse promptement et avec force, aussi bien dans la peau que dans les viscères.

A première vue, pour expliquer ce phénomène inattendu, on pouvait se demander si l'absence de la réaction ne dépendait pas d'une modification de la perméabilité vasculaire qui aurait pu se produire au cours de la double injection préparante. Mais, dans le même ordre d'idée, on pouvait songer aussi à la possibilité d'une intervention d'un facteur de diffusion « spreading factor » de Duran-Reynals, dont on connaît les remarquables qualités de diffusion et de perméabilisation tissulaire. Ce principe se trouve en abondance dans les extraits tirés de divers organes, notamment de glandes testiculaires.

Des recherches orientées dans ce sens ont montré cependant que la modification de la perméabilité vasculaire provoquée au cours des injections du filtrat microbien à l'aide de β -imidazol-éthylamine (histamine) pour l'accroître, ou à l'aide de N-diméthyl-

amino-méthyléthyl-dibenzoparathiazine (phénergan) pour la diminuer, ne semble pas jouer un rôle important dans le déterminisme de non-apparition du phénomène, puisque ces médiateurs ne changent en rien les résultats obtenus à la suite de la double injection préparante et que la modification de perméabilité qu'ils provoquent, n'entrave nullement l'apparition du phénomène de Sanarelli ou de Shwartzman classique conditionné, on le sait, par l'unique injection préparante.

Quant à l'action de l'extrait testiculaire, on a pu voir que, loin d'entraver l'apparition de la réaction hémorragique, le facteur diffusif de Duran-Reynals contribue, au contraire, à son éclosion.

En réalité, l'extrait testiculaire s'est révélé un facteur activant et stimulant de l'hémorragie et, en tout cas, contrebalançant l'effet de la double préparation par injections dermique et intra-veineuse, pratiquées simultanément. Que l'extrait testiculaire renforce et accélère la réaction de Shwartzman, nous est bien connu par les travaux de Bier [2], de Duran-Reynals [3], de Shwartzman [4]. Nous-même avons fait connaître que l'extrait aqueux d'un tissu cutané ou simplement un sérum sanguin, sont capables de stimuler et d'exalter l'action du filtrat préparant à l'égard du phénomène de Shwartzman [5].

Dès lors, il était naturel de se demander s'il ne faut pas chercher dans l'action de l'extrait testiculaire un effet dû plutôt à la présence de protéines dans cet extrait. L'expérience a confirmé cette hypothèse car, en remplaçant l'extrait testiculaire par des protéines banales, telles que le sérum de cheval, le blanc d'œuf et le lait de vache, les résultats ont été en tous points comparables à ceux obtenus avec l'extrait testiculaire. Ainsi, de cette étude, deux faits saillants peuvent être retenus : 1° la modification de la perméabilité capillaire dans le sens de l'augmentation ou dans celui de la diminution n'exerce aucune influence sur le résultat négatif de l'expérience pratiquée avec une double injection préparante ; 2° le phénomène hémorragique apparaît malgré la double injection préparante, si l'on a eu soin d'ajouter au filtrat utilisé de l'extrait testiculaire, du sérum de cheval, du blanc d'œuf ou du lait de vache.

Cette apparition du phénomène, qui se réalise sous l'effet des protéines, nous mène forcément à la question de savoir comment va se comporter, vis-à-vis de l'injection déchaînante, un animal préalablement sensibilisé à ces protéines et qui a reçu vingt heures auparavant la double injection préparante.

I. — MATÉRIEL.

On prend des lapins adultes et robustes de 1 500 à 2 000 g sans préférence de pelage ni de sexe. Pour la sensibilisation,

nous avons utilisé du sérum de cheval de l'Institut Pasteur de Bruxelles, du blanc d'œuf recueilli par ponction d'un œuf fraîchement pondu et du lait cru de vache, peu après la traite.

II. — TECHNIQUE.

Une première injection de 2 ml est faite dans l'épaisseur de la peau. Elle se résorbe rapidement sans laisser de traces. Vingt-quatre heures après, une deuxième injection de 4 ml est administrée dans les veines et, vingt-quatre heures après encore, une troisième et dernière injection de 6 ml est pratiquée par voie veineuse. Ces injections intraveineuses sont également bien supportées et n'entraînent aucune réaction locale ou générale. Cette technique nous procure une bonne et solide sensibilisation.

Les animaux ainsi sensibilisés sont laissés au repos pendant vingt et un jours avant d'être soumis aux expériences finales.

Le filtrat d'*E. coli* ϕ employé, est, comme lors de nos études antérieures, obtenu par filtration d'une culture en bouillon Difco, âgée de 6 jours.

Les injections préparantes cutanées sont faites dans la peau du flanc. Les injections préparantes intraveineuses, de même que les injections déchaînantes, sont administrées par la veine marginale de l'oreille. Les résultats sont lus au cours des vingt-quatre heures qui suivent l'injection déchaînante.

Notre première expérience a porté sur un lot de 12 lapins, dont 4 sensibilisés au sérum de cheval, 4 au blanc d'œuf et 4 au lait de vache.

A tous ces animaux, nous avons injecté 0,5 ml de filtrat d'*E. coli* ϕ dans la peau et, en même temps, 1 ml dans la veine. C'était la double injection préparante.

Après un intervalle de vingt-quatre heures, nous leur avons administré 2 ml du même filtrat dans les veines. C'était l'injection déchaînante.

RÉSULTATS. — Parmi les lapins sensibilisés au sérum de cheval, nous avons trouvé, deux heures après l'injection déchaînante : 1 lapin mort, porteur d'une large plaque hémorragique de Shwartzman. L'ouverture de la cage thoracique nous a montré des taches hémorragiques de Sanarelli dans les poumons, et, dans la cavité abdominale, nous avons trouvé des caillots de sang. Six heures après, un deuxième lapin est mort. Celui-ci présentait également des lésions hémorragiques à la peau, ainsi que dans les viscères, notamment dans les poumons et les reins. Les deux derniers lapins sont sacrifiés le lendemain. L'un d'eux ne présentait que la réaction de Shwartzman et l'autre la réaction de Sanarelli.

Parmi les lapins sensibilisés au blanc d'œuf : un est porteur

d'une réaction de Shwartzman, apparue 3 heures après la déchainante. Il est sacrifié aussitôt et l'autopsie montre que les reins et tout le grêle sont hémorragiques. Un deuxième lapin est également atteint d'une réaction de Shwartzman prononcée. Il meurt dans la nuit. L'autopsie montre qu'il était aussi porteur de lésions hémorragiques pulmonaires, rénales et coliques. Le troisième est porteur d'un Shwartzman à caractère purpurique. Il est sacrifié le lendemain. A l'autopsie, on trouve des pétéchies du gros intestin et du grêle. Le quatrième n'a pas réagi et était indemne de toute réaction hémorragique de la peau et des viscères.

Enfin, parmi les lapins sensibilisés au lait de vache, deux sont morts deux heures après l'injection déchainante. Chez l'un, on a trouvé un Shwartzman peu développé, mais un Sanarelli d'une intensité considérable couvrant toute la surface du poumon. Chez l'autre, la peau était normale, mais les viscères étaient hémorragiques. Des deux lapins restants, l'un est porteur de la réaction de Shwartzman. L'autopsie pratiquée le lendemain révèle que les viscères sont normaux. Le dernier, sacrifié également le lendemain, n'a révélé aucune réaction. L'animal n'a donc pas réagi ni par un Shwartzman ni par un Sanarelli.

Cette expérience, bien que portant sur un nombre restreint d'animaux, nous a fourni cependant des résultats meilleurs qu'on ne pouvait espérer. En effet, sur 12 lapins, on en compte 6 victimes d'emblée de réactions de Sanarelli et de Shwartzman, 2 porteurs uniquement de réactions de Shwartzman, 2 uniquement de réactions de Sanarelli et 2 lapins indemnes de toute réaction. Un tel bilan nous a encouragé à étendre l'expérience à un plus grand nombre d'animaux.

Nous avons donc préparé un lot de 30 lapins. De ce lot, 10 lapins, que nous appelons série A, sont sensibilisés au sérum de cheval, 10, série B, sensibilisés au blanc d'œuf et 10, série C, sensibilisés au lait de vache.

Après l'intervalle de vingt et un jours, nous pratiquons chez tous ces animaux la double injection préparante du filtrat d'*E. coli* ϕ . Ils reçoivent respectivement, 0,5 ml dans la peau et, en même temps, 1 ml dans les veines. Après le délai habituel de vingt-quatre heures, nous leur injectons 2 ml du filtrat déchainant.

RÉSULTATS. — Dans la série A, 3 lapins ont réagi fortement par un phénomène de Shwartzman, 4 ont réagi avec une intensité moyenne, 2 faiblement et 1 n'a pas réagi. Tous ces animaux sont sacrifiés le lendemain. La réaction de Sanarelli était présente chez les 7 premiers lapins et absente chez les 3 derniers. Dans la série B, 1 lapin est mort trois heures après l'injection déchainante, présentant une réaction purpurique à la peau et de sévères réactions hémorragiques dans les poumons, reins et intestin

grêle. Un deuxième lapin, mort peu après le premier, présentait également des réactions de Schwartzman et de Sanarelli dans les poumons et les reins. Les 8 lapins restants ont été sacrifiés le lendemain. Tous manifestaient des réactions de Schwartzman à la peau et de Sanarelli dans les viscères. Dans la série C, 3 lapins sont morts deux heures après la déchaînante. Chez l'un, on

Tableau de l'expérience III.

	NUMÉRO D'ORDRE	DOUBLE injection préparante <i>F. E. coli</i> en ml		INTERVALLE 24 heures	INJECTION déchainante <i>F. E. coli</i> en ml	RÉSULTATS des réactions	
		I. D.	I. V.			de Shwartzman	de Sanarelli
						Peau	Viscères
10 lapins sensibilisés au sérum de cheval.	1	0,5	1		2	+	++
	2	»	»		»	++	++++
	3	»	»		»	++	++++
	4	»	»		»	+	+
	5	»	»		»	++++	++
	6	»	»		»	+++++	+++++
	7	»	»		»	+	+++++
	8	»	»		»	— — —	++++
	9	»	»		»	+++++	+++++
	10	»	»		»	++	— — —
10 lapins sensibilisés au blanc d'œuf.	1	0,5	1		2	++++	++++
	2	»	»		»	— — —	++
	3 (1)	0	0		0	0	0
	4	»	»		»	++++	++++
	5	»	»		»	+	++++
	6	»	»		»	++++	++++
	7	»	»		»	++++	++++
	8	»	»		»	++	++
	9	»	»		»	+++	— — —
	10	»	»		»	++++	+++
10 lapins sensibilisés au lait de vache.	1	0,5	1		2	+	++++
	2	»	»		»	++++	++++
	3	»	»		»	++++	++++
	4	»	»		»	++++	++
	5	»	»		»	++++	++
	6	»	»		»	++++	+
	7	»	»		»	++++	++++
	8	»	»		»	++	++++
	9	»	»		»	+	++++
	10 (2)	»	»		0	0	0

F. E. coli, filtrat *Escherichia coli*; I. D., injection intradermique; I. V., injection intraveineuse; +++++, réaction très forte; +++, réaction forte; ++, réaction d'intensité moyenne; +, réaction faible.

(1) Lapin 3, mort au cours de la sensibilisation.

(2) Lapin 10, mort avant l'injection déchaînante.

trouve un Shwartzman positif et un Sanarelli intense, surtout dans les poumons. Chez l'autre, la réaction de Shwartzman ainsi que celle de Sanarelli sont bien développées. Chez le troisième lapin, la peau est fortement hémorragique et l'on trouve de nombreuses taches hémorragiques dans l'intestin, l'épiploon et des caillots de sang dans le péritoine. Parmi les 7 lapins restants, tous sont porteurs des réactions de Shwartzman. Ils sont sacrifiés le lendemain. A l'autopsie, on constate qu'ils sont également atteints de lésions hémorragiques de Sanarelli.

Mais voici une autre expérience, particulièrement frappante, que nous schématisons dans le tableau ci-joint.

Ces résultats prouvent donc indiscutablement qu'un animal préalablement sensibilisé à une quelconque protéine réagira à la double injection préparante cutanée et intraveineuse.

De même, comme nous l'avons déjà démontré antérieurement, cette double préparation donnera lieu également à des phénomènes hémorragiques chez un animal neuf, c'est-à-dire non sensibilisé au préalable à une protéine, à condition que la protéine soit administrée en mélange avec le filtrat. De plus, il apparaît encore que, pour être efficace, la protéine ne doit pas nécessairement être utilisée en mélange avec le filtrat. Injectée isolément dans un point de la peau ou dans un muscle, immédiatement avant ou après la double injection du filtrat préparant, elle entraîne l'apparition régulière des réactions hémorragiques de Sanarelli et de Shwartzman.

L'expérience suivante en est la preuve. A un lot de 8 lapins, nous injectons : 2 ml de sérum de cheval dans la peau du dos des 4 premiers et 2 ml dans les muscles de la cuisse des 4 suivants.

Ensuite, nous faisons la double injection du filtrat préparant l'*E. coli* ϕ , en leur administrant en même temps 0,5 ml dans la peau du flanc et 1 ml dans les veines.

Après l'intervalle habituel de vingt-quatre heures, nous pratiquons chez tous ces animaux, l'injection intraveineuse de 2 ml du filtrat déchaînant.

RÉSULTATS. — Les 4 premiers lapins ont répondu par une réaction de Shwartzman et de Sanarelli positive. Chez l'un, la réaction de Shwartzman était faible. Par contre, la réaction de Sanarelli était très marquée dans les poumons et les reins. Chez le deuxième, le Shwartzman était d'intensité moyenne et le Sanarelli faible, sous forme de points purpuriques disséminés dans le poumon. Chez le troisième et le quatrième, la réaction de Shwartzman était intense et s'accompagnait de fortes réactions de Sanarelli dans les poumons, les reins et le gros intestin.

Quant aux quatre derniers lapins, ils ont montré, trois heures déjà après l'injection déchaînante, un début de réaction de

Shwartzman qui, le lendemain, s'était transformée en plaques hémorragiques typiques. L'autopsie a révélé de nombreuses pétéchies et des taches hémorragiques de Sanarelli disséminées dans les poumons, les reins, l'intestin et l'épilon.

Ces expériences, répétées d'ailleurs avec le même succès, semblent prouver avec une netteté parfaite que la protéine utilisée soit isolément au cours de la double injection préparante, soit en mélange avec le filtrat, donne des résultats identiques, alors que, répétons-le, la double injection du seul filtrat chez un lapin neuf demeure sans effet.

En présence de cette allure tantôt négative, tantôt positive du phénomène hémorragique, il nous a paru important de rechercher les modifications histologiques subies par la zone cutanée au cours de ces différentes phases et de les confronter avec celles qui se manifestent au cours de la réaction de Shwartzman classique.

Ces examens histologiques ont donc porté primo : sur la peau des animaux soumis à des injections préparantes, dermique et intraveineuse, effectuées simultanément à l'aide du filtrat pur ; secundo : sur la peau des animaux ayant reçu simultanément ces deux injections préparantes, l'injection dermique étant constituée de filtrat en mélange avec une protéine, l'injection intraveineuse, de filtrat pur ; tertio : sur la peau des animaux qui ont reçu l'injection préparante du filtrat uniquement dans le derme, suivant la technique classique de Shwartzman ; quarto : enfin, sur la peau de ces trois catégories d'animaux, après qu'ils ont reçu l'injection du filtrat déchainant.

Nous ne donnerons ici qu'une description sommaire des lésions que nous avons été à même de constater grâce à l'aide amicale du docteur Louis Van der Meiren, chef du Département anatomo-pathologique du service universitaire de dermatologie.

I. — Fragment de peau de lapin A, traité par la technique de Shwartzman, qui a donc reçu dans le derme une injection du filtrat préparant et prélevé, vingt-quatre heures après, au voisinage du lieu d'inoculation.

« Infiltration diffuse de polynucléaires, moins marquée au niveau du corps papillaire, peu condensée dans le derme. Dans la partie profonde du derme, des capillaires béants dont le revêtement endothélial est effracté sur une grande partie de leur pourtour, centrent sur eux une réaction cellulaire dense et homogène. Cette disposition périvasculaire des cellules inflammatoires aboutit à la formation de nodules qui tranchent sur le fond de la trame collagène envahie par ailleurs d'une façon diffuse. »

II. — Fragment de peau provenant du même lapin A, prélevé vingt-quatre heures après l'injection déchainante, au niveau du siège de la réaction hémorragique.

« Le collagène est effracté et dissocié en tractus minces par un phénomène hémorragique violent; les capillaires sont nombreux et béants : leurs parois mal dessinées. Les polynucléaires sont en état de lyse avancée. »

III. — Fragment de peau du lapin B, qui a subi la double injection préparante du filtrat pur, prélevé vingt-quatre heures après, à l'endroit où fut pratiquée l'injection dermique.

« Dans cette préparation, aucun phénomène inflammatoire n'altère la structure du derme; on observe, immédiatement sous l'épiderme, dans un territoire assez bien délimité du corps papillaire, de la périvasculature à polynucléaires. »

IV. — Fragment de peau provenant du même lapin B, prélevé vingt-quatre heures après l'injection du filtrat déchaînant, au niveau de la région préparée.

« On trouve une infiltration sous-endothéliale plus dense que dans l'échantillon précédent; le derme moyen et profond ne présente aucune particularité. »

V. — Fragment de peau du lapin C, qui a été soumis à la double injection préparante, dont l'injection dermique est effectuée à l'aide d'un mélange composé de filtrat et de sérum de cheval. Le fragment est prélevé vingt-quatre heures après, au niveau de cette injection dermique.

« Dans cette préparation, l'envahissement par des polynucléaires est à peu près général sur toute l'étendue du derme. L'infiltrat, tantôt dissocie le collagène, tantôt constitue des masses compactes et homogènes. L'inflammation forme des manchons autour de l'appareil folliculoglandulaire : de nombreux capillaires sont altérés. »

VI. — Fragment de peau provenant du même lapin C, prélevé vingt-quatre heures après l'injection déchaînante au niveau de la plaque hémorragique.

« Les phénomènes hémorragiques sont prédominants : des plages de globules rouges s'insinuent dans un collagène grillagé. Un processus d'œdème donne au conjonctif un aspect alvéolaire. On trouve des nids de polynucléaires disséminés en différents points de la préparation. »

Ces recherches histologiques, tout élémentaires qu'elles soient, corroborent entièrement les constatations macroscopiques faites au cours des expériences. Sans doute mériteraient-elles une étude beaucoup plus poussée. Mais c'est là un aspect de la question, qui demanderait à lui seul un long chapitre d'études et qui sortirait du but actuel de nos recherches.

De tous les faits expérimentaux accumulés, il est encore bien malaisé de tirer une conclusion formelle.

Le phénomène de non-apparition et réapparition des réactions hémorragiques comporte en lui-même un élément de mystère

qu'il serait présomptueux d'ignorer. On peut être tenté d'avancer, comme essai d'explication, un rapprochement avec les phénomènes d'allergie, d'anergie, et si nous l'avons fait antérieurement, c'est surtout dans le but de suggérer aux chercheurs la nécessité d'une remise de toute la question sur le métier, d'une urgence de clarifier rigoureusement la valeur des termes employés.

Nous pensons qu'il est actuellement plus fructueux de pousser le plus loin possible l'étude des observations expérimentales, de multiplier les constatations de *faits*, avant d'émettre une explication théorique qui, à l'heure actuelle, serait prématurée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. ALECHINSKY. *Ces Annales*, 1952, **82**, 412, 424.
- [2] O. G. BIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 407, 410.
- [3] F. DURAN-REYNALS. *J. exp. Med.*, 1933, **58**, 451, 463.
- [4] G. SHWARTZMAN. *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 621, 644.
- [5] A. ALECHINSKY. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, 289 ; 1937, **124**, 291, 292.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 5 Février 1953.

Présidence de M. GASTINEL.

COMMUNICATIONS

SPÉCIFICITÉ DES IMMOBILISINES RÉCURRENTIELLES ENTRE LE *BORRELIA DUTTONI* ET LE *BORRELIA HISPANICA*

par A. VAISMAN, A. HAMELIN et C. LEVADITI.

(Institut Alfred Fournier.)

Depuis la découverte des « immobilisines tréponémiques » par Nelson et Mayer [1], le problème de la spécificité des effets de ces anticorps à l'égard des différents genres, espèces et variétés de spirochètes s'est posé. Etant donné les difficultés que nous avons rencontrées jusqu'ici à obtenir des souches de *Treponema pallidum* utilisables dans ce but, nous nous sommes adressés, pour étudier ce problème, à des spirochètes récurrentiels, tels que *Borrelia duttoni* et *Borrelia hispanica* [2].

C. Levaditi, A. Vaisman, A. Hamelin [3] ont décelé récemment dans le sérum de souris, de rats et de cobayes examinés au cours de l'évolution de la spirillose provoquée par le *Borrelia duttoni*, des immobilisines spécifiques capables d'agir sur ces parasites. Elles y ont persisté pendant une longue période de temps, leurs effets étant à la fois immobilisants et lytiques. L'ultracentrifugation, qui sédimente les « réagines » syphilitiques, ne paraît exercer qu'une influence légère sur les immobilisines anti-récurrentielles qui, de ce point de vue, paraissent se comporter à l'exemple des immobilisines anti-tréponémiques [4]. Au cours de l'évolution de la phase inapparente de la spirillose [5] provoquée chez le rat et la souris par l'inoculation du *Borrelia duttoni*, les spirilles « résiduels » isolés soit du cerveau, soit du sang ou de la rate, se montrent résistants aux immobilisines sériques, leur résistance étant susceptible d'être transmise, pendant un certain nombre de passages, par voie héréditaire. C'est là une démonstration expérimentale

remarquable de la coexistence possible d'une spirillose inapparente et de la présence simultanée d'immobilisines humorales.

Nous exposons, dans la présente note, nos résultats concernant l'activité immobilisante *homologue* et *hétérologue* des sérums d'animaux infectés par ces deux espèces de *Borrelia*, la *duttoni* et l'*hispanica*.

TECHNIQUE. — Nous avons examiné le pouvoir immobilisant des sérums de souris, de rats et de cobayes, infectés soit par le *B. duttoni*, soit par le *B. hispanica*, sérums prélevés à différentes époques après le début de l'infection. Le pouvoir immobilisant de ces sérums a été éprouvé soit sur des parasites cultivés *in vitro* (milieu de Mesnil), soit sur des germes provenant du sang de souris infectées. L'examen a été fait en présence de complément frais de cobaye et l'intensité d'immobilisation déterminée en pourcentage de parasites immobiles après dix-huit heures de séjour à 35°, en anaérobiose (technique de Nelson).

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Des données résumées dans ce tableau, il résulte ce qui suit :

I. SÉRUMS D'ANIMAUX INFECTÉS AVEC LE *BORRELIA DUTTONI*. — *Souris*. — 4 souris, contaminées depuis trente et un à deux cent cinquante-sept jours, ont fourni les sérums soumis à l'examen.

a) En présence de *B. duttoni*, les immobilisines, dont le taux oscille entre 0 et 4 p. 100 chez les souris normales, s'élèvent à 80 et 84 p. 100 dès le trente et unième jour après l'infection, mais elles descendent au taux de 30 et 20 p. 100 aux cent quatre-vingt-dix-huitième et deux cent cinquante-septième jours après l'infection.

b) En présence de *B. hispanica*, aucune immobilisation notable n'a été observée avec les sérums des animaux témoins ou anciennement contaminés.

Rats. — a) 3 rats, infectés depuis cent vingt-huit jours, ont fourni des résultats positifs atteignant 100 p. 100 d'immobilisation vis-à-vis des *B. duttoni* cultivés, ou présents dans le sang de souris contaminées. Une lyse partielle a également été notée, ainsi que le prouve un appauvrissement sensible du milieu en *Borrelia*.

b) Dans les mêmes conditions, mais en présence de *B. hispanica*, les sérums de ces mêmes animaux ont fourni des taux d'immobilisation variant entre 2 et 10 p. 100 [sauf pour l'un d'entre eux qui a révélé une faible immobilisation (30 p. 100) en présence de spirilles provenant de sang de souris].

II. SÉRUMS D'ANIMAUX INFECTÉS AVEC LE *BORRELIA HISPANICA*. — *Souris*. — a) Les sérums de 10 souris, infectées depuis trente et un à cent quarante-deux jours, ont été éprouvés vis-à-vis du *B. duttoni*. Ils ont révélé une immobilisation variant entre 0 et 10 p. 100, considérée comme *négative*.

b) Par contre, ces mêmes sérums, mis au contact de *B. hispanica* (espèce homologue) immobilisent fortement ceux-ci, le taux d'immobilisation, qui était de 50 p. 100 le trente-quatrième jour après l'infection, atteignant 100 p. 100 à une période plus tardive de l'évolution de la maladie (cent quarante-deuxième jour). Nous avons noté également une lyse partielle des germes, plus importante lorsque l'immobilisation était totale.

TABLEAU.

	ACTION sur <i>Borrelia duttoni</i> p. 100 d'immobilisation		ACTION sur <i>Borrelia hispanica</i> p. 100 d'immobilisation	
	Spirochètes de culture	Spirochètes de souris	Spirochètes de culture	Spirochètes de souris
<i>Sérums d'animaux infectés avec le Borrelia duttoni.</i>				
<i>Souris :</i>				
Infection de 31 jours	80		4	
— 31 —	84		6	
— 198 —		30		2
— 257 —		20		
<i>Rats :</i>				
Infection de 128 jours	100 L. P. (*)	100 L. P.	2	10
— 128 —	100 L. P.	100 L. P.	10	30
— 128 —	100 L. P.	100 L. P.	8	4
<i>Sérums d'animaux infectés avec le Borrelia hispanica.</i>				
<i>Souris :</i>				
Infection de 31 jours		0		75 L. P.
— 31 —		4		75 L. P.
— 34 —	2		50	
— 36 —	6	0	56	50 L. P.
— 36 —				
— 55 —		8		75 L. (*)
— 55 —		2		100 L. P.
— 55 —		4		50 L. P.
— 142 —		10		100 L.
— 142 —		6		100 L.
<i>Rats :</i>				
Infection de 27 jours	10		100 L. P.	
— 27 —	8		100 L. P.	
— 27 —	2		96 L. P.	
— 82 —		2		100 L.
— 82 —		8		100 L.
— 82 —		4		98 L.
<i>Cobayes :</i>				
Infection de 28 jours	2	0	100 L. P.	100 L. P.
— 148 —	8	6	90 L. P.	60 L. P.
— 148 —	4	4	100 L. P.	80 L. P.
<i>Témoins :</i>				
Souris neuve, n° 1	2	0	6	4
Souris neuve, n° 2	4	2	2	2
Emulsion de spirochètes en présence de complément frais.	2	0	2	2

(*) L., lyse; L. P., lyse partielle.

Rats. — a) Les 6 rats infectés depuis vingt-sept et quatre-vingt-deux jours par le *B. hispanica* ont donné un test *négatif* en présence des *B. duttoni* (immobilisation variant entre 2 et 10 p. 100).

b) Des immobilisines anti-*hispanica* ont été mises en évidence lorsque les sérums de ces mêmes animaux furent mis au contact de *B. hispanica*, espèce homologue, leur taux atteignant 96 à 100 p. 100 (sans toutefois que nous ayons noté d'écarts importants en rapport avec la durée de l'infection).

Cobayes. — Des résultats comparables à ceux enregistrés avec le sérum de rats ont été constatés chez les cobayes infectés par le *B. hispanica* depuis vingt-huit et cent quarante-huit jours.

CONCLUSION. — 1° Des immobilisines homologues apparaissent dans les sérums de souris, de rats et de cobayes infectés soit par le *BORRELIA DUTTONI*, soit par le *BORRELIA HISPANICA*, le phénomène d'immobilisation s'accompagnant d'une lyse partielle des parasites.

2° Cependant, cette activité immobilisante homologue des sérums anti-récurrentiels n'implique pas ipso-facto des effets semblables envisagés sous l'angle hétérologue. En effet, de tels sérums se montrent totalement inactifs, ou, tout au plus, partiellement doués de potentiel immobilisant à l'égard de spirilles appartenant à une espèce différente de celle ayant servi d'antigène.

Il en résulte que l'utilisation de la réaction des immobilisines sériques, selon la méthode de Nelson, permet de différencier, du point de vue immunologique, des espèces de spirillacées, telles que le *BORRELIA DUTTONI* et le *BORRELIA HISPANICA*. Il y a donc lieu de prévoir que ladite méthode pourra éventuellement être utilisée pour identifier des souches tréponémiques biologiquement dissemblables, provenant d'accidents de la période tardive de l'infection (ulcérations et gommes tertiaires, paralysie générale), alors que tout semble prouver la coexistence, dans de tels accidents, de principes immobilisants humoraux, d'une part, de virus pathogène, de l'autre.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] NELSON et MAYER. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 369.
- [2] E. SERGENT et A. POURET. *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1952, **30**, 11.
- [3] C. LEVADITI, A. VAISMAN et A. HAMELIN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 256.
- [4] A. VAISMAN et A. HAMELIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 156.
- [5] C. LEVADITI, A. VAISMAN et A. HAMELIN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 437.

SYMBIOSE ENTRE LE VIRUS COXSACKIE, SOUCHE B NEUROTROPE, ET CELUI DU LOUPING-ILL

par C. LEVADITI et J. HENRY-EVENO.

(Institut Alfred Fournier.)

Nous conformant au programme que nous nous sommes fixé dès le 5 avril 1951, concernant l'étude du problème de la symbiose, ou, au contraire, de l'antagonisme entre le virus Cocksackie, souche B encéphalitogène, et divers autres ultragermes, voire même des spirilles, dans le névraxe des souriceaux nouveau-nés, nous exposerons dans la présente note nos investigations se rapportant à l'association du virus du louping-ill et de l'agent étiologique découvert par Dalldorf et Sickles. Rappelons que nos précédentes recherches ont porté sur les possibilités de symbiose entre le virus encéphalitogène Cocksackie et ceux de la vaccine [1], de la poliomyélite type Lansing [2], de la lymphogranulomatose inguinale [3], de l'encéphalite Theiler [4], de la fièvre aphteuse neurotrope [5], de l'encéphalomyélite Est [6], de la rage négrigène (souche Tanger) ou fixe [7], de l'herpès [8], et, enfin, un spirille récurrentiel (*Borrelia duttoni*) [9]. Les résultats ont été variables (association possible ou antagonisme) suivant la nature du virus associé.

Technique. — Nous avons d'abord précisé les caractères histologiques (encéphalite typique) des lésions provoquées dans l'encéphale des souriceaux et des souris adultes, par l'inoculation intranévraxique du virus du louping-ill, les altérations dues au virus Cocksackie chez les souriceaux étant bien définies à l'heure actuelle (encéphalite parenchymateuse et cœlogénèse [10]). Ensuite, nous avons préparé des mélanges d'émulsions de cerveaux de souriceaux morts d'encéphalite Cocksackie et d'encéphales de souris adultes ayant succombé par suite d'inoculations semblables de virus du louping-ill, mélanges que nous avons injectés, par voie transcranienne, à des souriceaux âgés de 3, 4 ou 5 jours. Le cerveau de ces derniers animaux, prélevé après leur décès, a été testé : a) Du point de sa vue de sa teneur en virus Cocksackie, par inoculation à de nouveaux souriceaux et b) En ce qui concerne la présence du virus du louping-ill, par transfert intracérébral à des souris adultes. Contrôle histo-pathologique des résultats enregistrés.

Résultats. — Ces résultats sont condensés dans le tableau ci-joint. Ils autorisent à formuler les conclusions suivantes :

1° Le virus Cocksackie a été présent dans le cerveau des souriceaux (morts ou sacrifiés malades entre le deuxième et le cinquième jour) lors de la primo-inoculation, ainsi que des 4 passages consécutifs sur des souriceaux nouveau-nés ; nulle dérogation à cette règle (lésions de + à +++ et à ∞ dans tous les cas) ;

2° La persistance de l'association entre le virus Cocksackie et celui du louping-ill a été indubitable dans les mêmes conditions. En effet, les

TABLEAU.

PRIMO INOCULATION ET PASSAGES	RÉSULTATS											
	Souriceaux. Coxsackie						Souris adultes. Louping-ill					
	Total des animaux	Morts ou sacrifiés après : (en jours)	Lésions Coxsackie				Total des animaux	Morts ou sacrifiés après : (en jours)	Lésions Louping-ill			
			++ +	+	0	Total (1)			++ +	+	0	Total (1)
<i>Primo-inoculation</i>	7	3 à 5	6	1	0	7/7	4	4 à 9	3	1	0	4/4
<i>1^{er} passage</i>	6	3 à 4	3	3	0	6/6	5	3 à 9	4	1	0	5/5
<i>2^e passage</i>	9	2 à 4	5	3	1	8/9	5	5 à 10	3	2	0	5/5
<i>3^e passage</i>	6	3 à 5	6	0	0	6/6	5	4 à 10	4	1	0	5/5
<i>4^e passage</i>	5	4 à 5	4	1	0	5/5	5	4 à 7	3	2	0	5/5

(1) Le chiffre placé à droite du trait indique le nombre total d'animaux inoculés, celui placé à gauche le nombre d'animaux ayant présenté des altérations typiques.

souris adultes, toutes mortes en trois, quatre, cinq, sept, neuf et dix jours, ont contracté l'encéphalite type louping-ill (altérations cérébrales caractéristiques).

Il en résulte qu'une véritable symbiose est réalisable entre les deux ultragermes pris en considération, symbiose qui peut persister pendant 4 transferts consécutifs de souriceaux à souriceaux. Aussi, le virus du louping-ill devra-t-il être classé dans le groupe des viroses (fièvre aphteuse neurotrope, rage fixe et herpès) dont l'agent provocateur se prête à une symbiose persistante avec l'ultragerme Coxsackie, par opposition à d'autres virus pathogènes (tels ceux de la lymphogranulomatose inguinale et de la maladie de Theiler) ne jouissant que d'un potentiel symbiotique éphémère, et enfin à d'autres (vaccine, poliomyélite, encéphalomyélite Est, rage négrigène) radicalement incompatibles avec cet ultragerme.

CONCLUSION. — *La symbiose dans le névraxe des souriceaux nouveaux entre le virus Coxsackie, souche B encéphalitogène, et l'ultragerme du louping-ill est possible au cours de 4 transferts névragiques consécutifs.*

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1614.
- [2] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951, **80**, 678.
- [3] C. LEVADITI, A. VAISMAN et F. DUNOYER. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1234.
- [4] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951, **81**, 207.
- [5] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951, **81**, 210.
- [6] C. LEVADITI et J. HENRY-EVENO. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 892.

- [7] C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-EVENO. *Ces Annales*, 1952, **82**, 499 et 502.
[8] C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-EVENO. *Rev. Immunol.*, 1952, **46**, 117.
[9] C. LEVADITI et J. HENRY-EVENO. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 339.
[10] C. LEVADITI. *Ces Annales*, 1951, **81**, 260.

PRÉPARATION D'UN ANTIGÈNE PURIFIÉ (PROTAMINE-ETHER) POUR LA SÉROLOGIE DES AFFECTIONS DU GROUPE COXSACKIE

par J. DELPY.

(*Institut Pasteur, Service des Virus* [Docteur P. Lépine].)

Depuis qu'en 1949, J. Casals et ses collaborateurs [4] ont appliqué la réaction de déviation du complément à l'identification des virus du groupe Coxsackie, de nombreux auteurs ont publié différentes méthodes de préparation des antigènes, allant des plus simples aux plus complexes.

Howitt et Benefield [2] ont utilisé des suspensions non fractionnées de muscles de souris (seul le muscle étant prélevé), filtrées sur filtre Seitz et congelées et décongelées plusieurs fois.

Melnick et ses collaborateurs [3, 4] ont décrit un antigène purifié par le sulfate de protamine et concentré par ultracentrifugation.

Manire, Sulkin et Farmer [5] utilisent soit des suspensions brutes de souris infectées, soit le surnageant après centrifugation à 2 500 t/m pendant trente minutes.

Plus récemment, R.-L. Dodd [6] prépare un antigène purifié en précipitant les protéines par une solution de 0,5 p. 100 d'urate de potasse, puis une centrifugation à 18 000 t/m pendant trente minutes.

Enfin, Casals [7], depuis 1949, emploie la méthode d'extraction à l'acétone-éther, qu'il avait appliquée auparavant aux virus neurotropes en général [8] et définit ainsi les propriétés d'un antigène acceptable :

a) Être strictement spécifique. (Il attire l'attention sur le grand nombre de fausses réactions positives que donnent les sérums de syphilitiques avec les antigènes non délipidés.)

b) Avoir un titre élevé, pour mettre en évidence la plus petite quantité d'anticorps spécifiques.

c) Être d'une préparation suffisamment simple pour être exécutée dans un laboratoire doté d'un équipement ordinaire.

Nous avons, dans le cadre des recherches sérologiques du Service des Virus, essayé la plupart des méthodes.

Les extractions brutes, ou le surnageant de ces mêmes extractions, nous ont paru peu spécifiques, le plus souvent anti-complémentaires et réagissant avec la plupart des sérums Bordet-Wassermann positifs.

L'antigène purifié par le sulfate de protamine est souvent anti-

complémentaire, du fait d'un excès de protamine et, dans le cas contraire, réagit avec les sérums B. W. positifs. La concentration par ultracentrifugation, qui pallie dans une certaine mesure ces inconvénients, nécessite un laboratoire équipé d'un matériel complexe, notamment d'une ultracentrifugeuse d'une capacité suffisante et permettant d'atteindre 130 000 g au fond du tube.

Nous avons utilisé le plus souvent la méthode d'extraction à l'acétone-éther de Casals, qui nous a toujours donné un matériel très satisfaisant. Cependant, cette méthode comporte un stade où le virus se trouve à l'état pulvérulent et les risques de contamination nous ont paru non négligeables.

Nous avons cherché une technique de préparation satisfaisant aux conditions citées plus haut, en essayant d'éviter dans la mesure du possible les inconvénients rencontrés par nous avec les différentes méthodes.

Méthode de préparation. — Des souriceaux âgés de 48 heures sont inoculés, par voie sous-cutanée entre les 2 épaules, avec une émulsion à 10^{-1} d'un virus entraîné par plusieurs passages successifs (auquel on ajoute 200 U. de pénicilline et 1 mg de streptomycine par centimètre cube). Ainsi que le conseillent Contreras, Barnett et Melnick [9], les souriceaux sont sacrifiés trente-six à quarante-huit heures après l'inoculation, à la condition que la moitié au moins présentent des signes de maladie ; cet artifice permet d'obtenir un antigène de titre suffisant, même avec des souches peu virulentes comme Albany type 1 [10].

Les souriceaux sont saignés, pelés et éviscérés, puis pesés et broyés dans un mortier de grandes dimensions, préalablement refroidi, ainsi que le pilon, à -25° . En écrasant rapidement les tissus contre la paroi, de façon qu'ils se congèlent en couche mince, on obtient un broyat très fin, qui est ensuite mis en suspension dans 3 fois son volume de tampon au véronal [11]. L'ensemble est ensuite congelé et décongelé plusieurs fois, puis laissé une nuit à la glacière à $+4^{\circ}$.

Le lendemain, la suspension est centrifugée à froid (quinze minutes à 3 000 t/m) et le surnageant est prélevé ; à ce surnageant on ajoute 1 cg de sulfate de protamine en poudre par gramme de souriceau utilisé ; le tout est fortement agité afin de dissoudre la protamine le plus complètement possible, et laissé trente minutes à la glacière à $+4^{\circ}$, en agitant de temps à autre [12]. Il se produit un précipité abondant qui est centrifugé à froid pendant quinze minutes à 3 000 t/m.

Le surnageant est prélevé et additionné d'un volume égal d'éther refroidi. Après avoir plusieurs fois agité et laissé reposer à la température du laboratoire, il se produit une prise en masse brutale du mélange, sous forme d'un gel homogène qui, centrifugé à faible vitesse, se divise en trois phases distinctes :

a) Un surnageant d'éther (cette phase est parfois très réduite, l'éther restant plus ou moins combiné avec le gel intermédiaire) ;

b) Une phase gélatineuse compacte ;

c) Un fond aqueux, qui peut être très facilement décanté à la pipette.

L'éther restant dans la phase aqueuse est évaporé sous cloche à vide (pendant environ une heure), après quoi, cette phase est centrifugée à froid pendant une heure à 10 000 t/m, puis stérilisée aux

rayons ultra-violetes et utilisée comme antigène pour la déviation du complément.

Depuis quatre mois, nous avons utilisé cet antigène, conservé à la glacière à -70° , pour nos réactions de déviation du complément sur plaques (Lépine, Sautter, Delpy et Artzet, [43]), dérivées de la méthode de Fulton et Dumbell ; il nous a donné des résultats très satisfaisants.

Partant du même stock de souriceaux virulents, nous avons employé cette méthode parallèlement à celle de Casals et avons obtenu des résultats comparables tant du point de vue du titre que du point de vue rendement, avec les trois souches :

France 50-328 (antigéniquement semblable à Albany A, type I) ;

France 50-358 (antigéniquement semblable à Albany A, type II) ;

Albany groupe A, type III

que nous employons couramment pour les réactions sérologiques.

D'un point de vue purement expérimental, nous avons poussé la purification de la souche T. II jusqu'à six extractions à l'éther, et avons obtenu un matériel qui avait conservé un certain titre antigénique et un pouvoir virulent élevé. Ce matériel, concentré par ultracentrifugation, nous a permis d'obtenir des images des corpuscules de virus au microscope électronique.

Nous avons, d'autre part, lyophilisé l'antigène type II sans observer de perte appréciable du pouvoir spécifique.

Enfin, une étude en cours, non publiée, nous permet de penser que les différentes manœuvres subies au cours de la purification n'abaissent que très faiblement le pouvoir antigène, en même temps que la virulence ne baisse que d'environ 0,7 log après 3 extractions à l'éther, alors que le taux des protéines totales tombe à 20 p. 100 environ du taux primitif

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. CASALS, P. K. OLITSKY et L. C. MURPHY. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **72**, 636.
- [2] B. F. HOWITT et U. R. BENEFIELD. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **73**, 90.
- [3] J. L. MELNICK. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 342.
- [4] L. M. KRAFT et J. L. MELNICK. *J. exp. Med.*, 1950, **92**, 483.
- [5] G. P. MANIRE, S. E. SULKIN et T. W. FARMER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **73**, 341.
- [6] R. L. DODD. *Annual report of the Division of Laboratories and Research, New York State Department of Health*, Albany, 1950.
- [7] J. CASALS et P. K. OLITSKY. *Fed. Proceed.*, 1950, **9**, 570.
- [8] J. CASALS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **70**, 339.
- [9] G. CONTRERAS, V. H. BARNETT et J. L. MELNICK. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 395.
- [10] J. L. MELNICK et L. M. KRAFT. *Fed. Proceed.*, 1950, **9**, 585.
- [11] M. M. MAYER, A. G. OSLER, O. G. BIER et M. HEIDELBERGER. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 535.
- [12] J. WARREN, M. L. WEIL, S. F. RUSS et H. JEFFRIES. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **72**, 662.
- [13] P. LÉPINE, V. SAUTTER, J. DELPY et F. ARTZET. *Ces Annales*, 1953, **84**, 684.

FIXATION D'ANTIGÈNES BACTÉRIENS, DE VIRUS GRIPPAL, D'HÉMAGGLUTINE VACCINALE SUR HÉMATIES

par E. EDLINGER et J. VIEUCHANGE.

[*Institut Pasteur. Service du Bactériophage et Service des Virus (1).*]

Les hématies de certaines espèces animales ont la propriété de fixer, dans des conditions données, soit des antigènes bactériens, soit des virus, soit des substances présentes dans les suspensions de tissus infectés avec certains virus.

Dans le cas des antigènes du bacille de la tuberculose ou des antigènes Vi et O d'*Entérobactériacea*, cette fixation peut être mise en évidence par un phénomène d'hémagglutination passive, au moyen des anticorps spécifiques, selon la technique décrite pour l'antigène tuberculeux, par Middlebrook et Dubos [1].

Dans le cas des virus, la fixation des corpuscules à la surface de la bactérie entraîne une hémagglutination directe, c'est le phénomène décrit par Hirst [2] et par Mc Clelland et Hare [3] pour le virus grippal et ultérieurement par d'autres auteurs pour divers virus.

Dans le cas de substances distinctes des unités virulentes, leur fixation entraîne également une agglutination directe des hématies : c'est ce que l'on observe quand on met en présence des suspensions de virus vaccinal et certaines hématies [4].

Les phases successives de ces divers phénomènes, agglutination passive, agglutination directe, ne sont pas superposables dans l'un ou l'autre cas. Il existe toutefois une phase commune : c'est la fixation de l'un ou l'autre de ces agents sur l'hématie.

Mais le mécanisme lui-même de cette fixation, relativement bien connu en ce qui concerne le phénomène de Hirst, l'est moins bien en ce qui concerne les autres. Il nous a semblé intéressant de rechercher : 1° S'il est possible de sensibiliser les mêmes hématies avec plusieurs antigènes bactériens à la fois et 2° Si les hématies sensibilisées aux antigènes bactériens conservent leur sensibilité à l'égard du virus de la grippe ou de l'hémagglutinine vaccinale.

TECHNIQUE. — Hématies. — Nous avons utilisé dans ces expériences des hématies de poulet. Nous avons choisi des animaux donneurs dont les globules rouges étaient agglutinés par l'hémagglutinine de la vaccine. Les hématies étaient préparées par 3 lavages successifs dans l'eau physiologique.

Sensibilisation des hématies. — La sensibilisation a toujours été effectuée de la même manière : à 20 cm³ d'une suspension d'hématies à 0,25 p. 100 dans l'eau physiologique, on ajoutait 1 cm³ d'un ou plusieurs

(1) Certaines manipulations techniques ont été effectuées par M. E. Laval

antigènes bactériens. Les suspensions étaient ensuite placées à l'étuve à 37° sous agitation mécanique constante, pendant deux heures. Elles étaient ensuite lavées trois fois dans l'eau physiologique, par centrifugation à 3 000 t/m, pendant cinq minutes.

Antigènes bactériens. — Antigène Vi : une culture irisée (forme Vi de *S. typhi* (type A) sur plaque de gélose, a permis de préparer une suspension bactérienne dans l'eau physiologique [5, 6]. Après centrifugation, le liquide surnageant a été utilisé comme antigène Vi.

Antigène O. — Une culture non irisée (forme W) de *S. typhi* O 901 sur plaque de gélose a servi à préparer une suspension bactérienne dans l'eau physiologique. Seuls les liquides surnageants des suspensions bactériennes préalablement chauffées à 100° ont permis de sensibiliser les hématies, fait déjà observé par Corvazier [6].

Antigène tuberculeux. — Nous avons utilisé l'antigène délivré par l'Institut Pasteur pour la réaction d'hémagglutination dans la tuberculose.

Réaction d'hémagglutination passive. — Une série de tubes de Kahn recevait : 1° 0,5 cm³ de la suspension des hématies sensibilisées à un taux constant (0,25 p. 100) ; 2° 0,5 cm³ d'un des trois antisérums à des dilutions croissantes : sérum anti-Vi Ballerup, anti-« O », ou, sérum antituberculeux de cheval (2).

Des tubes témoins étaient préparés : 1° avec des hématies sensibilisées et de l'eau physiologique ; 2° avec des hématies sensibilisées et un antisérum n'ayant pas été préparé avec l'un des antigènes utilisés pour la sensibilisation des hématies ; 3° avec des hématies non sensibilisées et l'un ou l'autre des trois antisérums.

La lecture de la réaction se faisait après deux heures de séjour à la température du laboratoire et était contrôlée vingt heures après par une seconde lecture. Les caractères du sédiment des hématies dans le fond de chaque tube permettaient de constater ou non la présence d'une hémagglutination. L'étalement des hématies en un disque homogène occupant toute la surface du fond du tube, traduisait une agglutination positive.

Réaction d'hémagglutination par les virus. — A 0,25 cm³ d'une suspension d'hématies sensibilisées à 0,25 p. 100 on ajoute, sous un volume égal, des dilutions croissantes soit du liquide allantoïdien d'embryon de poulet infecté avec le virus grippal, souche PR8, soit d'une suspension de membranes chorio-allantoïdiennes d'embryon de poulet infectées avec le virus vaccinal.

Une série de tubes témoins est préparée dans les mêmes conditions avec des hématies non sensibilisées et une autre série comporte simplement des hématies sensibilisées ou non et de l'eau physiologique.

La lecture se fait après une heure de séjour à la température du laboratoire.

Le tableau I résume les résultats de nos expériences :

Ces résultats montrent qu'il est possible de sensibiliser des hématies avec plusieurs antigènes bactériens à la fois ; cette conclusion est en tout cas valable pour les antigènes étudiés dans nos expériences :

(2) Le Dr Le Minor nous a fourni les deux premiers sérums, M. Boisvert le troisième. Nous leur exprimons nos remerciements.

TABLEAU I.

HÉMATIES sensibilisées avec	ANTISÉRUMS (2)			VIRUS de la grippe PA 8 (5)	HÉMAGGLUTININE de la vaccine (3)	TÉMOIN eau physiologique
	Vi	O	Tb			
Antigène Vi . . .	1 : 25 600	0	0	1 : 2 560	1 : 480	0
Antigène O	0	1 : 640	0	1 : 2 560	1 : 480	0
Antigène Tb (1) . .	0	0	1 : 1 024	1 : 2 560	1 : 480	0
Vi + O	1 : 25 600	1 : 640	0	1 : 2 560	1 : 480	0
Vi + Tb	1 : 25 600	0	1 : 1 024	1 : 2 560	1 : 480	0
O + Tb	0	1 : 640	1 : 1 024	1 : 2 560	1 : 480	0
Vi + O + Tb	1 : 25 600	1 : 640	1 : 1 024	1 : 2 560	1 : 480	0
Non sensibilisées .	0	0	0	1 : 2 560	1 : 480	0

(1) Antigène Tb ou Tb, antigène tuberculeux.
(2) Dans les colonnes sont indiquées les dernières dilutions de sérum pour lesquelles on note une hémagglutination passive. 0, absence d'hémagglutination.
(3) Dans les colonnes sont indiquées les dernières dilutions de virus ou d'hémagglutinine pour lesquelles on note une agglutination.

les antigènes Vi et O des bacilles typhiques, et l'antigène tuberculeux. De plus, il est possible d'obtenir pour chaque antigène ainsi fixé une réaction d'hémagglutination passive au moyen du sérum correspondant, sans que le taux limite de cette réaction soit abaissé. En d'autres termes, la fixation de ces divers antigènes sur les hématies est rendue manifeste par l'addition d'antisérums spécifiques qui déterminent une hémagglutination passive élective. Il ne semble donc pas qu'il y ait, au niveau de l'hématie, compétition ou interférence entre les divers antigènes bactériens étudiés. Chacun agirait pour son propre compte.

De ces résultats on peut encore conclure que les hématies déjà sensibilisées avec l'un ou l'autre ou avec l'un et l'autre des trois antigènes bactériens étudiés ou encore avec les trois ensemble conservent toute leur agglutinabilité par le virus de la grippe ou par l'hémagglutinine vaccinale, sans la moindre diminution du taux d'agglutinabilité.

En présence de ces résultats, on pouvait se demander si les antigènes bactériens se fixaient sur toutes les hématies au contact desquelles ils étaient placés ou sur une partie d'entre elles seulement. Les essais que nous avons effectués avec des mélanges d'hématies non sensibilisées et d'hématies sensibilisées en proportions définies, ne nous ont montré aucun phénomène d'entraînement au cours des réactions d'hémagglutination passive.

Des résultats analogues ont été obtenus avec l'hémagglutinine vaccinale : il n'a pas été observé d'entraînement des hématies non sensibles au cours de l'hémagglutination. Etant donné, d'autre part, les images électroniques des hématies agglutinées par le virus grippal [7], il semble qu'on puisse écarter l'hypothèse d'une fixation sur une partie seulement des hématies quels que soient le virus ou l'antigène bactérien que l'on fasse agir sur la suspension de globules rouges.

Les constatations que nous avons faites au cours de nos divers essais ne permettent pas toutefois de préciser la nature exacte de la fixation des antigènes bactériens sur l'hématie. S'agit-il d'une fixation élective sur des récepteurs différents ? S'agit-il d'une simple action de surface, autrement dit d'une fixation discontinue sur quelques zones de l'hématie, laissant des zones libres en quantité suffisante pour permettre la fixation des antigènes utilisés dans nos essais ? Ces questions restent posées. Mais, de même qu'il existe des différences importantes, en ce qui concerne les mécanismes de leur fixation, entre le virus grippal et l'hémagglutinine vaccinale [8, 9], nos constatations conduisent à supposer que le mécanisme de la fixation des antigènes bactériens diffère des précédents et, de plus, n'est probablement pas univoque.

Enfin, il ressort de nos expériences que la réaction de Dubos-Middlebrook dans la tuberculose peut être aisément effectuée avec des hématies de poule.

RÉSUMÉ. — 1° Il est possible de sensibiliser une suspension d'hématies de poulet avec plusieurs antigènes bactériens à la fois : antigènes Vi et O du bacille typhique et antigène tuberculeux.

On obtient pour chaque antigène ainsi fixé une réaction d'hémagglutination passive au moyen de l'antisérum correspondant, sans que le taux limite de cette réaction soit abaissé.

2° Les hématies déjà sensibilisées avec l'un ou l'autre ou avec l'un et l'autre des trois antigènes étudiés, ou encore avec les trois ensemble, conservent toute leur agglutinabilité par le virus de la grippe ou par l'hémagglutinine vaccinale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. MIDDLEBROOK et R.-J. DUBOS. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 51.
- [2] G. K. HIRST. *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 69.
- [3] L. MC CLELLAND et R. HARE. *Canada publ. Health J.*, 1941, **32**, 530.
- [4] F. P. O. NAGLERN. *Med. J. Austral.*, 1942, **1**, 281.
- [5] L. LE MINOR, S. LE MINOR et J. GRABAR. *Ces Annales*, 1952, **83**, 62.
- [6] P. CORVAZIER. *Ces Annales*, 1952, **83**, 173.
- [7] J. M. DAWSON et W. J. ELFORD. *J. gener. Microbiol.*, 1949, **3**, 298.
- [8] F. M. BURNET et W. C. BOAKE. *J. Immunol.*, 1946, **53**, 1.
- [9] J. VIEUCHANGE et J. GIUNTINI. *Ces Annales*, 1952, **83**, 487.

ÉTUDE
DE QUELQUES BACTÉRIOPHAGES TYPHIQUES Vi
MORPHOLOGIE DES CORPUSCULES
AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE,
ASPECT DES PLAGES ET THERMOSENSIBILITÉ

par J. GIUNTINI, E. EDLINGER et P. NICOLLE.

(*Institut Pasteur.*
Service des Virus et Service du Bactériophage.)

Les bactériophages typhiques Vi I, II, III et IV ont été isolés par Craigie et Brandon, 1936 [1], et par Craigie et Yen, 1937-1938 [2, 3, 4]. On sait que ces bactériophages agissent spécifiquement sur les bacilles typhiques de forme Vi et sont dépourvus d'activité sur les formes Vi négatives de la même espèce.

Par adaptations du phage Vi II faites parallèlement sur un grand nombre de souches de bacille typhique, Craigie et Yen, 1938 [4], ont obtenu plusieurs préparations bactériophagiques qui leur ont permis de subdiviser l'espèce *S. typhi* en un certain nombre de « types Vi ». Par la suite on s'est servi également de préparations adaptées provenant d'autres bactériophages Vi. Cette méthode est la lysotypie (en anglais : phage typing). Elle présente avant tout, comme on le sait, un très grand intérêt pratique en épidémiologie (voir Nicolle, Jude et Buttiaux, 1950 [5] ; Nicolle, Hamon et Edlinger, 1953 [6]).

L'intérêt théorique de la lysotypie du bacille typhique est également très grand puisque, comme le fait très justement remarquer Anderson [7], cette méthode permet des investigations très fructueuses sur tous les problèmes concernant les relations entre le bactériophage et son hôte bactérien : la fixation, la multiplication, la lyse, les phénomènes d'interférence entre bactériophages différents, la lysogénéité et les mutations vers la résistance.

Pour que de semblables études puissent être menées à bien, il est évidemment très important que les bactériophages typhiques Vi soient très soigneusement étudiés.

Craigie et Yen (*loc. cit.*) ont décrit l'aspect morphologique et les dimensions des plages produites dans les cultures en couche continue de bacilles typhiques par les phages Vi I, II, III et IV. Ils ont déterminé la température d'inactivation complète des corpuscules après trente minutes à divers degrés. Ils ont étudié les propriétés antigéniques de ces bactériophages et ont tenté d'établir une classification d'après les épreuves de neutralisation croisée par leurs sérums antiphages. De ces caractères, ils ont pu déduire quelle était l'échelle des dimensions relatives de leurs phages Vi. On sait en effet, d'après les travaux d'Elford et d'Andrewes [8] qu'il existe une relation inverse, pour les bactériophages agissant sur une même bactérie,

entre les dimensions des plages et les dimensions des corpuscules, les bactériophages à petits corpuscules donnant par conséquent les plus grandes plages. D'autre part, Wollman et Wollman [9] ont montré que la même relation inverse se retrouve entre les dimensions corpusculaires et la thermosensibilité.

TABLEAU I. — Résultats de Craigie et Yen

VI-PHAGE	GRANDEUR des plages	DESTRUCTION complète après chauffage (30 min.) à	TAILLE PRÉSUMÉE des corpuscules
I	Petite.	67-70° C	Grande.
II	Moyenne.	69-72° C	Moyenne.
III	Grande.	61-64° C	Petite.
IV	Moyenne.	59-62° C	Moyenne.

Nous nous sommes proposé de reprendre les expériences de thermosensibilité et d'étude morphologique des plages formées par les phages Vi et nous les avons complétées par des examens au microscope électronique.

Nous limiterons la présente étude aux bactériophages Vi I, II et IV, nous réservant de consacrer une note ultérieure au phage Vi III qui présente quelques particularités intéressantes.

EXPÉRIENCES. — Les phages Vi proviennent du Central Enteric Reference Laboratory (Dr Felix). Nous avons utilisé comme souche sensible la souche type A de *S. typhi*, de même provenance. Cette souche conservée sur milieu de Dorset a été repiquée au moment de l'emploi en eau peptonée à 0,3 p. 100 additionnée de 0,3 p. 100 de glucose et de 0,04 p. 100 de chlorure de calcium. Ce dernier sel est en effet utile pour la multiplication des phages.

Examinons d'abord l'aspect des plages.

Nous avons utilisé la méthode de Gratia [40] dite de « la double couche de gélose ». Dans un tube, on laisse tomber II gouttes d'une suspension dense de bacille typhique, on ajoute I goutte du bactériophage à étudier, diluée de telle façon que le titre ne dépasse pas quelques dizaines de corpuscules par goutte. Puis on ajoute 3 cm³ d'un bouillon gélosé à 0,7 p. 100 qu'on a maintenu liquide en le plongeant dans un bain-marie à 50°. Le tout est versé à la surface d'une plaque de gélose à 2 p. 100 (fig. 1).

Les plages du phage I sont relativement petites (diamètre, 0,5 mm) tandis que les plages des phages II et IV sont plus grandes et ont des dimensions assez voisines (diamètre 2,3-2,5 mm).

Pour l'étude de la thermosensibilité nous avons procédé de la façon suivante : les suspensions de phages sont diluées avec de l'eau distillée de manière à obtenir des titres de l'ordre de 10³ corpuscules par centimètre cube. Les tubes sont mis au bain-marie à la température voulue et laissés pendant des temps différents. On prélève à intervalles réguliers un échantillon de 0,1 cm³. Le prélèvement ou sa

dilution à 1/10 est déposé sur des boîtes de gélose préalablementensemencées avec *S. typhi*. La comparaison avec le nombre de plages avant le chauffage donne le pourcentage de corpuscules détruits. On trouvera ici les résultats obtenus à la température de 60°.

La figure 2 montre que le phage Vi I est nettement plus résistant

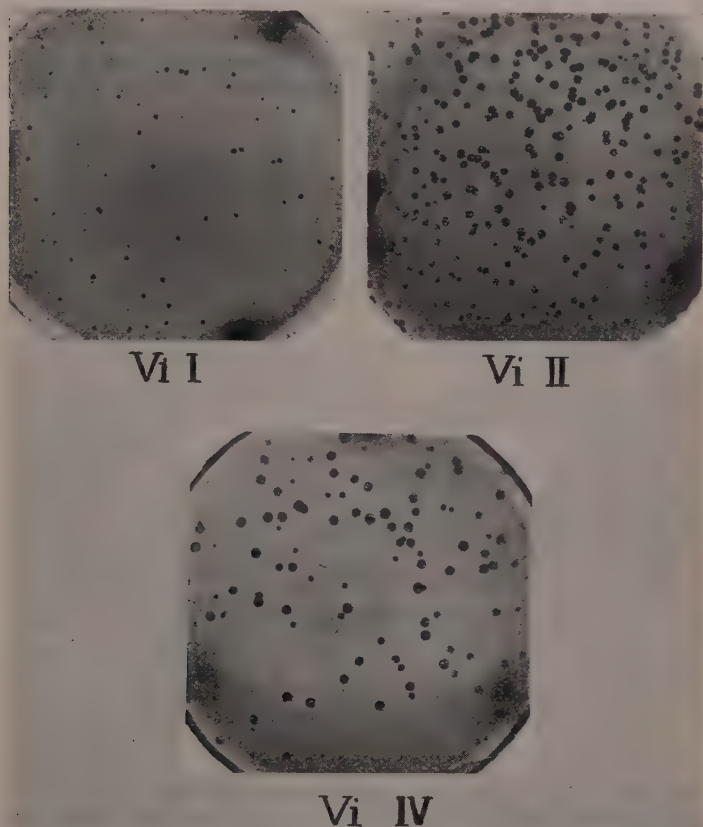


FIG. 1. — Aspect des plages des phages typhiques Vi.

que les phages II et IV, qui sont plus sensibles, mais ne montrent que peu de différence entre eux.

Les préparations pour le microscope électronique ont été d'abord l'objet de différents essais. En effet, il fallait obtenir une préparation aussi pure que possible et, d'autre part, contenant un titre élevé en phages. Après avoir utilisé un milieu synthétique et des centrifugations à vitesse élevée, nous nous sommes aperçus que les conditions les plus pratiques et les plus efficaces étaient les suivantes :

Au milieu ci-dessus indiqué (0,3 p. 100 d'eau peptonée, 0,3 p. 100 de glucose et 0,04 p. 100 de CaCl_2) on ajoute une suspension d'environ 10^5 de germes. Après séjour dans l'agitateur à 37° pendant quatre ou cinq heures, c'est-à-dire vers le milieu de la phase logarithmique de la croissance, on ajoute 1 cm^3 de bactériophage pour 10 cm^3 de culture et on laisse le tout à l'agitateur jusqu'à obtention d'une lyse apparemment complète. A ce moment, on met le lysat au réfrigérateur (à $+4^\circ$) pendant vingt-quatre heures. Ensuite, on filtre sur une bougie Chamberland L3 qu'on a préalablement lavée avec de l'eau distillée. Immédiatement après, on centrifuge le filtrat à 7 000 t/m

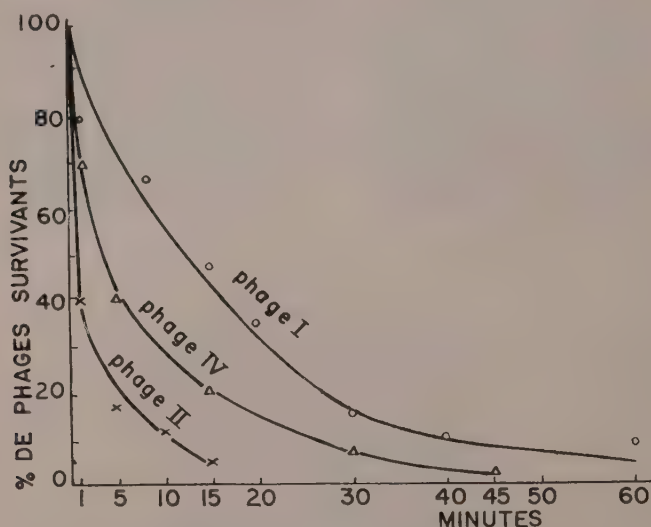


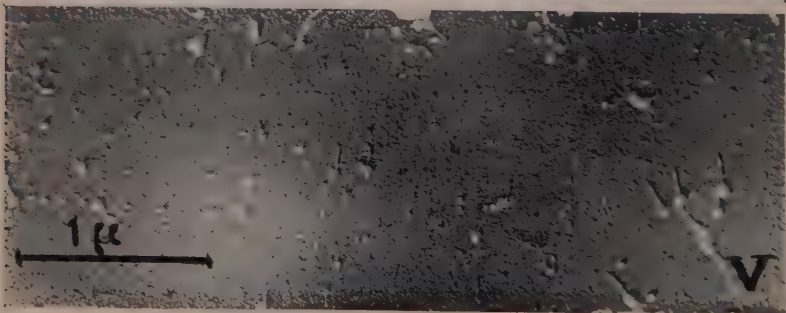
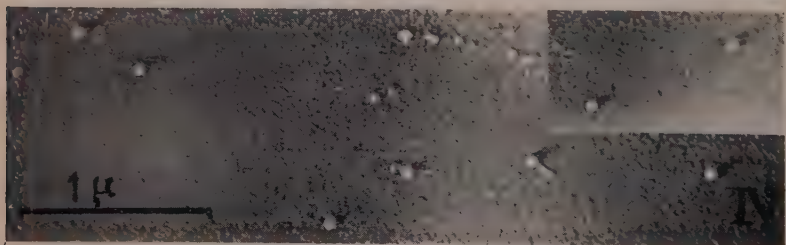
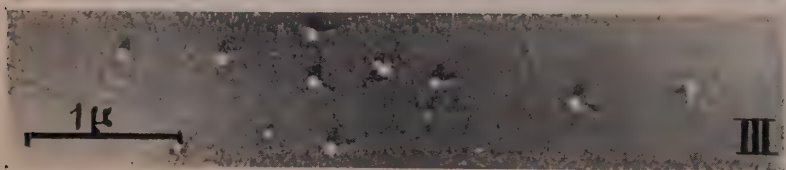
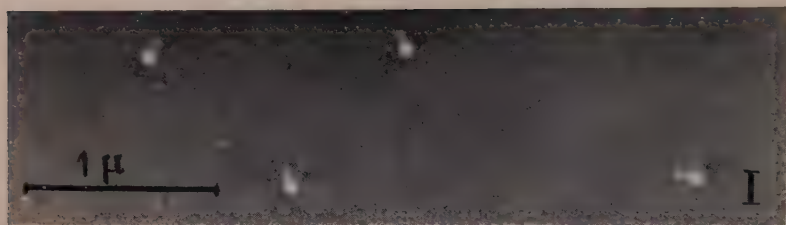
FIG. 2. — Destruction de phages Vi par chauffage à 60° .
o, phage I; Δ , phage IV; \times , phage II.

pendant quinze minutes. On prélève le surnageant qu'on dilue avec 20 parties d'eau distillée. Cette dilution est conservée au réfrigérateur jusqu'à la préparation des porte-objets.

Comme porte-objets, nous nous sommes servi de grilles métalliques couvertes d'une membrane de collodion. L'ombrage a été réalisé par évaporation sous vide d'or-palladium sous un angle de 15° .

Les images ont été obtenues avec une accélération des électrons de 80 000 volts et dans un grossissement électronique de 16 000 X.

RÉSULTATS. — Le phage I se présente avec une tête sphérique d'environ $100 \text{ m}\mu$ de diamètre et une courte queue d'environ $65 \text{ m}\mu$ de long et de $12 \text{ m}\mu$ de large. L'extrémité de la queue est fortement renflée. Le corpuscule paraît être enveloppé d'une gaine moins dense. Il est possible que cette apparence soit due à un artéfact, mais l'existence d'une structure hétérogène ne peut être exclue.



Le phage II possède une tête sphérique de 40 à 50 m μ de diamètre et la longueur de la queue est d'environ 100 m μ . Dans la plupart des cas la queue est extrêmement mince et terminée par un renflement. Fréquemment elle présente une légère courbure.

Les préparations du phage IV n'ont jamais pu être obtenues dans un état de pureté comparable à celui des deux précédents. Elles étaient parsemées de granulations très nombreuses, sur la nature desquelles nous ne pouvons faire que des suppositions : formes non spécifiques ou résidus bactériens ?

Les corpuscules du phage IV ont une tête arrondie d'un diamètre de 50 à 60 m μ . La queue très mince a une longueur d'environ 100 m μ .

DISCUSSION. — Les trois bactériophages typiques Vi que nous avons étudiés présentent au microscope électronique la morphologie qui a été rendue classique par les travaux de Ruska [41] et de Luria, Delbrück et Anderson [42].

Cependant il existe entre eux des différences d'aspect et de dimensions assez nettes. Le phage Vi I est de beaucoup le plus gros. Sa queue est très courte (moins des deux tiers du diamètre de la tête) et se termine par un renflement marqué. Il semble être enveloppé d'une gaine. Les phages II et IV sont plus petits et possèdent une queue longue et grêle munie d'un léger renflement. Il ne semble pas y avoir une grande différence dans leurs dimensions respectives. La tête du phage II serait sphérique, tandis que celle du phage IV serait aplatie.

RÉSUMÉ. — Nos observations sur l'aspect des phages et la thermosensibilité de ces trois bactériophages Vi sont en accord avec les données antérieures de Craigie et Yen.

Ces résultats sont complétés et confirmés par nos recherches sur leur morphologie au microscope électronique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. CRAIGIE et K. F. BRANDON. *J. Path. Bact.*, 1936, **43**, 233 et 249.
- [2] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Transact. Roy. Soc. Canada*, 1937, **5**, 79.
- [3] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Canada publ. Health J.*, 1938, **29**, 448.
- [4] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Canada publ. Health J.*, 1938, **29**, 484.
- [5] P. NICOLLE, A. JUDE et R. BUTTIAUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 246.
- [6] P. NICOLLE, Y. HAMON et E. EDLINGER. *Biol. méd.*, 1953 (à paraître).
- [7] T. F. ANDERSON. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1950, **4**, 21.
- [8] W. J. ELFORD et C. H. ANDREWES. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 446.
- [9] E. WOLLMAN et E. WOLLMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **211**, 270.
- [10] A. GRATIA. *Ces Annales*, 1936, **57**, 652.
- [11] H. RUSKA. *Naturwissenschaften*, 1941, **29**, 367.
- [12] S. E. LURIA, M. DELBRÜCK et T. F. ANDERSON. *J. Bact.*, 1943, **46**, 57.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Images au microscope électronique obtenues directement à 16 000 \times avec une tension de 80 000 volts; les figures de la planche sont ensuite agrandies optiquement pour atteindre le grossissement total indiqué.

I, phage Vi I (\times 25 000); II, phage Vi I (\times 25 000); III, phage Vi II (\times 20 000); IV, phage Vi II (\times 25 000); V, phage Vi IV (\times 25 000).

ENQUÊTE SUR LES SALMONELLES CHEZ LES PORCS A SAIGON

par J. FOURNIER, P. DE LAJUDIE et E. R. BRYGOO.

(Institut Pasteur de Saigon.)

Sous toutes les latitudes le porc se classe au premier rang des porteurs de salmonelles. Les types qu'il héberge, *S. cholerae suis* notamment, sont parmi ceux qui se manifestent le plus souvent en pathologie humaine. Les observations de toxi-infections alimentaires dues à des salmonelles et consécutives à l'ingestion de charcuterie ne se comptent plus.

Il semble que dans les régions tropicales et subtropicales, et particulièrement dans le Sud-Est Asiatique, les porcs soient plus infectés qu'en Europe. Ainsi, Huisman [1], d'une part, en Hollande, et Kraneveld, Erber et Mansjoer [2], d'autre part, à Java, dirigeant les uns et les autres leurs investigations sur des porcs présumés sains et conduisant ces investigations de façon semblable (cultures des ganglions mésentériques et des viscères), trouvent, le premier, 4 p. 100 des sujets infectés par des salmonelles, alors que les seconds en trouvent 16,6 p. 100.

Une enquête sérologique faite par l'un de nous [3] à Shanghai (Chine), en 1942, a montré que les sérums de 65 p. 100 des porcs apparemment sains agglutinaient à des taux de dilution supérieurs à 1/25 une suspension chauffée de *S. cholerae suis*.

Cette infestation accrue des porcs dans le Sud-Est Asiatique mérite de retenir l'attention. Il s'agit en effet de régions où les animaux domestiques vivent avec l'homme dans une promiscuité non sans dangers pour ce dernier. La contagion directe y joue un grand rôle, alors qu'en Europe la contagion par la voie alimentaire est pratiquement la seule qui intervienne.

Il faut tenir compte aussi de la place plus importante que tient la viande de porc dans la ration carnée de l'habitant du Sud-Est Asiatique.

Ces raisons nous ont incités à entreprendre une enquête sur les salmonelles présentes chez les porcs amenés aux abattoirs de Saigon.

Ces porcs provenaient d'agglomérations situées dans le delta du Mékong ou sur la pointe de Camau (Cantho, Baclicu, Vinhlong, Mytho, Camau, Rachgia...)

L'enquête a comporté la recherche des germes par culture et la mise en évidence des agglutinines spécifiques dans le sérum des animaux.

I. CULTURES. — 1° *Matériel et méthodes.* — Le matériel ensemencé provient des ganglions mésentériques de 360 porcs adultes, dont 264 apparemment sains, les autres présentant des signes pathologiques divers : maigreur, diarrhée, suppurations, inflammation des ganglions mésentériques...

Les ganglions mésentériques de chaque animal étaient broyés séparément et stérilement en présence de sable. Le produit de broyage dilué au tiers avec de l'eau physiologique était ensemencé :

a) Sur gélose lactosée tournesolée en boîte de Petri.

b) En bouillon de Müller-Kauffmann ; après six heures d'incubation à 37°, on procédait à un repiquage à partir de chaque tube de bouillon sur gélose lactosée tournesolée.

Les colonies suspectes étaient prélevées et identifiées selon les techniques biochimiques et sérologiques habituelles.

Les immunsérums utilisés provenaient pour la plupart du Laboratoire des Salmonelles de l'Institut Pasteur, d'où ils nous avaient été envoyés par le Dr Le Minor avec indication de leur titre ainsi que des souches ayant servi à leur préparation et, le cas échéant, à leur saturation. Ce matériel nous a été précieux et nous exprimons ici notre gratitude au Dr Le Minor.

Le professeur Kauffmann a bien voulu identifier ou confirmer l'identification de 5 souches, ce dont nous le remercions bien vivement.

2° *Résultats et discussion.* — Nous avons isolé des salmonelles chez 9,6 p. 100 des porcs examinés. Ce pourcentage est sensiblement inférieur à celui qu'ont obtenu à Java Kraneveld et coll. (*loc. cit.*). Cela s'explique par ce fait que ces derniers ensemençaient pour chaque animal les broyats des ganglions mésentériques et ceux de différents viscères ; nous nous en sommes tenus aux seuls ganglions mésentériques.

Si l'on ne tient compte que des 86 bêtes présentant des signes pathologiques, la proportion de porteurs de salmonelles s'élève à 25,5 p. 100 dans notre statistique.

Les souches isolées par nous se répartissent de la façon suivante dans le schéma de Kauffmann-White.

TABLEAU I.

TYPE	FORMULE ANTIGÉNIQUE		NOMBRE DE SOUCHES
<i>S. paratyphi</i> B. . .	I, IV, V, XII	$b \Rightarrow 1,2$	4
<i>S. derby</i>	I, IV, XII	f, g	1
<i>S. paratyphi</i> C. . .	VI, VII	$c \Rightarrow 1,5$	1
<i>S. cholerae suis</i> . . .	VI, VII	$c \Rightarrow 1,5$	23
<i>S. joviana</i>	I, IX, XII	$l, z_{38} \Rightarrow 1,5$	1
<i>S. anatum</i>	III, X	$e, h \Rightarrow 1,6$	5

Les 4 souches du type *S. paratyphi* B appartiennent à la variété *paratyphi* B 1, de même que toutes celles que nous avons isolées chez l'homme. Nous avons vérifié la non-utilisation du *d*-tartrate par la réaction à l'acétate de plomb. Il faut noter cependant que l'attaque du glycérol en milieu de Stern est tardive avec l'une des souches, pour laquelle le virage de l'indicateur n'est manifeste qu'après quatre jours. Par ailleurs, les 4 souches sont dulcité-positives (18 h) et inosité-négatives. Une seule des 4 provient d'un porc malade.

S. derby est un type précédemment isolé par de nombreux auteurs

dans les ganglions mésentériques des porcs. Il a un rôle bien connu en pathologie humaine, particulièrement en ce qui concerne les gastro-entérites infantiles. L'un de nous [4] l'a isolé chez 5 malades à Shanghai (Chine). La souche que nous avons isolée provient d'un porc malade.

La présence de *S. paratyphi* C dans nos cultures est assez surprenante puisque ce type paraissait jusqu'à présent particulier à l'espèce humaine. Notre souche était, dès la première culture, dépourvue d'antigène Vi. Son identification nous a été confirmée par le professeur Kauffmann. Le porc chez qui nous l'avons isolée était apparemment sain.

Des 23 souches de *S. cholerae suis*, 21 appartiennent à la variété diphasique (American Type) et 2 à la variété monophasique (*kunzen-dorf*). La variété diphasique est la seule que nous ayons rencontrée jusqu'à présent chez l'homme à Saigon (11 souches isolées). Il y a là une différence très nette avec ce qui se passe en Europe où la variété *kunzen-dorf* est plus fréquente aussi bien chez l'homme que chez le porc. En ce qui concerne le Sud-Est Asiatique, Raynal et Fournier [5] à Shanghai (Chine) ont déjà signalé la prépondérance de la variété diphasique (American Type) sur la variété monophasique (*kunzen-dorf* ou « East European Type »). Seize de nos 23 souches proviennent de porcs malades.

La souche du type *S. javiana* a été identifiée par le professeur Kauffmann. Le type *javiana* a été cultivé pour la première fois à Batavia à l'occasion d'une diarrhée infantile. Notre souche provient d'un porc malade.

S. anatum, dont nous avons isolé 5 souches, est une salmonelle qu'on rencontre de façon courante dans le tube digestif d'une grande diversité d'animaux (mammifères et oiseaux) et qui joue un rôle non négligeable dans les toxi-infections alimentaires. L'un de nous [4] l'a isolée à Shanghai (Chine) chez 4 malades et chez un rat. Trois de nos cinq souches proviennent de porcs malades.

En définitive, les résultats de nos cultures montrent que les porcs de la région saïgonnaise hébergent dans une proportion importante des salmonelles connues comme pathogènes pour l'homme et qu'on a déjà rencontrées chez lui en différents points du Sud-Est Asiatique. Ils font apparaître aussi cette coïncidence remarquable que, chez l'homme comme chez le porc, la variante diphasique (American Type) de *S. cholerae suis* est nettement plus répandue que la variante *kunzen-dorf*.

Les résultats positifs sont six fois plus fréquents chez les porcs malades que chez les porcs sains, soit que les salmonelles aient été directement à l'origine des affections en cause, soit qu'elles aient montré une aptitude particulière à apparaître comme germes de sortie ou d'infection secondaire.

II. SÉRO-DIAGNOSTICS. — 1° *Matériel et méthodes*. — Nous avons prélevé aux abattoirs du sang de 150 porcs dont nous avons recueilli séparément les sérums.

Nous avons préparé nos suspensions-antigènes selon la technique recommandée par Kauffmann [6]. Les antigènes H étaient des cultures

en bouillon formolées de : *S. paratyphi* B spécif., *S. typhi* murium, *S. paratyphi* C, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. lexington*.

Les antigènes O étaient des suspensions chauffées deux heures à 100° C de : *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *S. paratyphi* C, *S. enteritidis*, *S. lexington*.

Les dilutions finales des sérums de porcs allaient de 1/50 à 1/400 en progression géométrique.

Nous avons fait la lecture des agglutinations H après deux heures au thermostat à eau à 52° C, celle des agglutinations O après quatre heures à l'étuve à 37° et douze heures à la température ambiante (28° C).

2° *Résultats et discussion.* — Trois sérums seulement ne donnèrent aucune agglutination ; 121 donnèrent simultanément des agglutinations H et O ; 4 ne donnèrent que des agglutinations H ; 22 ne donnèrent que des agglutinations O.

L'agglutination par le même sérum de plusieurs suspensions H ou de plusieurs suspensions O était un phénomène fréquent. Nous eûmes 33 sérums agglutinant 4 ou plus de 4 suspensions H et 47 sérums agglutinant 4 ou plus de 4 suspensions O. La suspension H de *S. typhi* ne fut jamais agglutinée. Le tableau II ci-dessous rend compte du nombre total d'agglutinations observées pour chaque suspension-antigène et pour chaque dilution des sérums.

TABLEAU II.

ANTIGÈNES H	1/50	1/100	1/200	1/400	ANTIGÈNES O	1/50	1/100	1/200	1/400
<i>b</i>	26	9	5	1	I, II, XII . . .	56	21	3	
<i>i</i> \Rightarrow 1,2 . . .	71	37	19	4	I, IV, V, XII .	45	16	4	
<i>c</i> \Rightarrow 1,5 . . .	87	51	22	9	VI, VII . . .	54	29	12	
<i>g, m</i>	71	43	19	8	I, IX, XII . . .	112	69	31	6
<i>z</i> ₁₀ \Rightarrow 1,5 .	46	16	7	2	III, X	116	79	29	7

D'après ce tableau, il semble que la proportion des salmonelles des groupes D et E chez les porcs doive être plus grande que ne l'indique le résultat de nos cultures (tableau I).

Dans son ensemble, cette recherche des agglutinines témoigne de la fréquence et de la diversité des salmonelloses porcines.

Le tableau III ci-dessous compare les chiffres obtenus par la présente

TABLEAU III.

ANTIGÈNES	SHANGHAI 1942 (p. 100)	SAIGON 1952 (p. 100)
I, II, XII	2,5	2,00
I, IV, V, XII		2,6
VI, VII	9,5	8,0
I, IX, XII	7,5	20,0
III, X	7,5	19,0

enquête sérologique aux chiffres correspondants d'une enquête menée en 1942 à Shanghai et relatés par Raynal et Fournier (*loc. cit.*).

Pour établir ce tableau, on n'a tenu compte que des agglutinations observées à un taux de dilution des sérums égal ou supérieur à 1/200.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — La culture des broyats de ganglions mésentériques de 360 porcs amenés aux abattoirs de Saigon a permis d'isoler 35 souches de salmonelles, dont 23 *S. cholerae suis*, 5 *S. anatum*, 4 *S. paratyphi* B, 1 *S. derby*, 1 *S. paratyphi* C et 1 *S. javiana*. Toutes ces espèces sont pathogènes pour l'homme et leur présence chez des malades a été signalée en différents points du Sud-Est Asiatique. A Saigon, comme à Shanghai (Chine), la variante diphasique (American Type) du *supestifer* est largement prépondérante sur la variante *kunzendorf*, aussi bien chez le porc que chez l'homme.

Un enquête sérologique montre l'extrême fréquence et la diversité des salmonelloses porcines au Sud Vietnam.

Le porc paraît donc y jouer un rôle important dans la conservation et la diffusion des salmonelles. Les Vietnamiens ne consomment généralement la viande de porc que très cuite ; mais la contagion directe est loin d'être exclue en raison des conditions d'habitation des populations rurales.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. HUISMAN. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 1951, **76**, 470.
- [2] F. G. KRANEVELD, M. ERBER et M. MANSJOER. *Hemera Zoa*, 1951, **58**, 48 et *Docum. Neerl. Indones. Morb. Trop.*, 1951, **3**, 343.
- [3] J. FOURNIER. *The Nat. Med. J. China*, 1942, **28**, 149.
- [4] J. FOURNIER. *Rapport sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de Shanghai pendant l'année 1949*. Tou Se We Press, Shanghai, 1950.
- [5] J. H. RAYNAL et J. FOURNIER. *Les Salmonelles à Shanghai*. Monographies de l'Institut Pasteur de Shanghai, Tou Se We Press, Shanghai, 1946.
- [6] F. KAUFFMANN. *The Diagnosis of Salmonella Types*, Thomas, Springfield, Ill., 1950.

OBTENTION DE FORMES L DE *BRUCELLA MELITENSIS*

par L. CARRÈRE et J. ROUX.

(Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté de Médecine de Montpellier.)

Poursuivant nos recherches sur les formes L des bactéries, nous avons tenté d'obtenir ces formes à partir de souches de *Br. melitensis* : nos essais nous ont révélé que la petite taille des *Brucella* n'était pas un obstacle à la formation de cellules géantes et de corps globuleux ; au contraire, parmi toutes les espèces que nous avons pu étudier, *Br. melitensis* présente des corps globuleux de volume maximum, en contraste semble-t-il avec *Bacillus anthracis*, par exemple, chez lequel les corps globuleux ne dépassent pas quelques μ de diamètre.

Pour les *Brucella*, comme pour les autres espèces, paraît se marquer la nécessité d'un récent isolement pour l'obtention en grand nombre des corps globuleux et l'évolution vers les formes L, du moins est-ce à partir d'une souche obtenue d'une première subculture que nous avons obtenu les meilleurs résultats.

Le protocole technique est le suivant :

A partir d'une culture de quarante-huit heures, sur albimi-agar, première subculture d'une souche de *Br. melitensis*, isolée par hémoculture chez un malade atteint de brucellose récente, on prélève quelques oses qui sont mises en suspension en eau peptonée, à laquelle sont ajoutées 2 000 unités de pénicilline et 0,1 ml de plasma humain par millilitre, étuve à 37°. Des prélèvements sont faits d'heure en heure et examinés entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase.

Contrairement à ce que d'autres ont vu, et nous-même avons noté, pour différents germes, la transformation des *Brucella* en corps globuleux paraît se faire selon un mode univoque de gonflement progressif.

Dès la première heure, on peut constater que quelques germes ont considérablement augmenté de volume, formant de petites masses arrondies de 5 à 6 μ de diamètre paraissant homogènes ; le nombre de ces corps globuleux augmente d'heure en heure, et pratiquement, à la vingtième heure, seules ces formes s'observent dans les préparations. C'est là un fait à souligner ; en général la transformation des bactéries en corps globuleux est plus lente, le pourcentage des bactéries évoluant vers ce stade est moins élevé, en bref, il semble que, du moins en ce qui concerne la souche de *Brucella* utilisée, chacun des germes a donné naissance à un corps globuleux.

Après quarante-huit heures, le tube présente une partie liquide paraissant optiquement vide et un dépôt assez abondant qui se remet lentement en suspension floconneuse par agitation.

L'examen, entre lame et lamelle, au microscope à contraste de phase, permet de se rendre compte que la partie liquide ne présente que de très rares corps globuleux et des formes L. Le dépôt est constitué par un agglomérat de corps globuleux de volume différent ; les diamètres varient, en effet, de 5 μ à 50 μ .

La constitution des corps globuleux est aussi très variée : alors que les moins volumineux se présentent sous forme de masses homogènes, colorables intensément en bleu par le Giemsa, avec de petites taches rouges, les plus volumineux sont ou vides ou emplis de fines granulations animées de mouvements browniens rapides, colorées en bleu par le Giemsa.

Tous les intermédiaires existent entre ces stades extrêmes ; on peut, en effet, suivre les phases successives qui des corps globuleux, par morcellement progressif des masses chromatiques, ou bien après vacuolisation totale, résultant de la fusion de deux ou trois vacuoles initiales qui ont accru progressivement leur volume, aboutissent aux fines granulations qui sont les formes L.

Si l'on reporte des prélèvements du dépôt dans divers milieux, additionnés ou non de pénicilline, de plasma ou d'un mélange de ces deux substances, on obtient les résultats suivants :

1° En eau peptonée ou albimi liquide. — On constate que les corps

globuleux de 5 μ à 6 μ . donc au premier stade, n'accroissent pas leur volume ; la masse chromatique se disloque en fragments qui donnent naissance à de petites formes cocco-bacillaires ou bacillaires mises en liberté par rupture de la membrane du corps globuleux.

Pour les corps globuleux déjà en voie de fragmentation, l'évolution est semblable à celle que nous venons de décrire et aboutit à des formes normales de *Brucella*.

Enfin, si les fines granulations sont déjà formées, on les voit disparaître par lyse. Nous n'avons pas pu saisir le passage d'une granulation à une forme bactérienne normale.

2° Dans les mêmes conditions, en présence de pénicilline seule ou de pénicilline-plasma, peu à peu tous les corps globuleux évoluent pour donner naissance à des formes L.

Les mêmes faits se produisent sur milieux semi-solides : grâce à ceux-ci, nous avons pu obtenir des colonies de formes L qui nous ont permis de faire les premiers essais d'inoculation à des souris. essais infructueux, utiles néanmoins comme indicatifs de techniques à suivre.

Nous avons indiqué, au début de ce court exposé, la nécessité de partir de souches récemment isolées, comme l'ont indiqué de nombreux auteurs. Pourquoi isolement récent ? Dire que, de ce fait, les souches bactériennes ont une aptitude plus marquée aux variations ou mutations sélectives ne résout rien. Ne peut-on penser simplement ceci : la possibilité pour une cellule microbienne, récemment isolée, de donner des formes L provient du fait que, dans l'organisme, des bactéries sont passées par cette phase évolutive, en opposition, de résistance ou d'adaptation, aux actions perturbatrices de leur métabolisme par les humeurs et cellules de l'hôte, et en ont conservé les aptitudes génétiques. Nous avons, en effet, montré la facilité d'obtention de corps globuleux et formes L *in vivo* et le retour à partir de ces stades aux formes habituelles pathogènes (1). Bien que le mécanisme de ces transformations ne soit pas encore élucidé, il peut servir de base à une hypothèse de travail.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE D'UNE COLICINE

par R. DEPOUX et Y. CHABBERT.

(Institut Pasteur.)

De multiples colicines, antibiotiques produits par certaines souches d'Entérobactéries, ont été étudiées *in vitro* [2, 3, 4]. Par contre, l'activité *in vivo* n'a été recherchée, semble-t-il, que sur la colicine V de Gratia [6], très sensible aux protéases qui la détruisent rapidement, et cette activité n'a jamais pu être montrée clairement. L'un de nous [4] a montré, grâce à une analyse bactériologique portant sur de multiples caractères, qu'un même germe pouvait produire un

(1) L. CARRÈRE et J. ROUX, *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 1647-1649.

complexe de colicines différentes. C'est ainsi que la souche *E. coli* 27 produit trois colicines dont une (colicine C3) diffère notablement de la colicine V : elle est beaucoup plus résistante aux enzymes protéolytiques, ce qui permet d'espérer une action *in vivo* ; elle est, par ailleurs, remarquablement active sur certaines *Salmonellae*, des groupes B et D notamment. Parmi elles, la souche de *Salmonella enteritidis* variété Danysz devait permettre de titrer les solutions de colicine C3 et d'effectuer une expérimentation aisée sur la souris.

Titrage. — La méthode des dilutions sériées en eau peptonée glucosée avec indicateur de pH ne peut être employée, en raison de la fréquence des mutants résistants. Le titrage par diffusion verticale en gélose s'est aussi révélé inutilisable, la pente des courbes standard étant trop faible. Nous avons alors adopté une méthode de dilution avec lecture photométrique au bout de quatre heures de culture. Le taux était obtenu par comparaison des points limites 50 p. 100 d'un étalon et du liquide à titrer. Le titre de 1 000 a été attribué à un échantillon de référence qui a toujours montré une inhibition voisine de 1/1 000 dans les conditions du titrage.

Production. — La production de colicine est facile à mettre en évidence sur plaque de gélose ordinaire par la méthode utilisée par Frédéricq [2]. La zone d'inhibition a un diamètre d'environ 40 mm, ses bords sont nets et sa surface est parsemée de quelques colonies de mutants résistants. En milieu synthétique solidifié par la gélose ou le silicogel, on obtient une zone d'inhibition sensiblement de même taille. Mais il ne nous a pas été possible d'extraire l'antibiotique ainsi produit dans le gel par les divers procédés utilisés par Halbert et Magnusson [4].

En bouillon ordinaire agité, le titre obtenu est, en règle, compris entre 150 et 200 ; l'addition de différents sucres au taux de 1 p. 100 permet d'élever le titre aux environs de 1 000. La dégradation plus ou moins poussée de la macération de viande ou de la peptone ne semble pas jouer un rôle notable, pas plus que la présence de certains acides aminés. L'aération violente est indispensable à la production de la colicine ; celle-ci n'est libérée dans le milieu de culture que lorsque la densité microbienne est très importante. La lyse des corps microbiens par divers procédés (ultrasons, congélation-décongélation, soude, broyage) n'a pas permis d'obtenir l'antibiotique.

En milieu synthétique liquide, nous n'avons jamais pu obtenir de quantités appréciables de colicine, quel que soit le moyen de culture utilisé (agitation violente et prolongée, insufflation à travers un verre fritté dans une colonne de milieu, culture sur les parois d'un manchon de cellophane).

Extraction. — Le produit obtenu en bouillon glucosé agité ne peut être purifié par dialyse, car il traverse la cellophane. L'extraction est impossible par les solvants organiques. Mais la colicine est précipitable dans les bouillons de culture par les sels neutres. Avec le sulfate d'ammonium à 50 p. 100 de saturation à 25 ou avec le sulfate de sodium à 40 p. 100 de saturation à 37 la presque totalité de la colicine est récupérée dans le précipité. La purification ainsi obtenue est très importante : le précipité obtenu avec le sulfate de soude à 40 p. 100 contient vingt-cinq fois moins d'azote que le filtrat initial.

Pour les essais *in vivo* nous avons utilisé une colicine ainsi purifiée ; son titre moyen était de l'ordre de 50 à 100 000 unités.

Propriétés. — La colicine C3 reste stable plusieurs mois à 4°. Elle résiste sans altérations pendant une heure à 60° et pendant quinze minutes à 100° ; elle perd à cette température 13 p. 100 de son activité en trente minutes et 22 p. 100 en une heure.

Elle est soluble dans l'eau à n'importe quel pH et reste stable à pH 2 pendant vingt-quatre heures. Elle est insoluble dans les solvants organiques et précipitable de sa solution aqueuse par les sels neutres. La colicine traverse facilement les feuilles de cellophane.

L'action des protéases est très variable : la trypsine en solution à 1/1 000 provoque une chute de titre de 64 p. 100, la pepsine une chute de 30 p. 100. Les protéases microbiennes ont peu d'action et la colicine n'est détruite que par certains *Bacillus*. Le titre n'est pas modifié par contact de dix-huit heures à 37° avec du sérum de lapin, de cheval ou de cobaye ; par contre, avec des tranches de foie ou de rein, la perte atteint 80 p. 100 pour le foie et 20 p. 100 pour le rein. Le contact avec un broyat d'intestin de souris ne modifie pas l'activité antibiotique.

Action « in vivo ». — La colicine C3 semble être dépourvue de toxicité pour la souris, qu'elle soit ingérée ou injectée sous la peau.

Le germe choisi pour infecter les souris fut *Salmonella enteritidis* variété Danysz, qui provoque une maladie mortelle en quatre à cinq jours après injection sous-cutanée de 1/4 de centimètre cube d'une culture de dix-huit heures en eau peptonée ou en trois à huit jours après ingestion d'une même quantité de germes.

Les souris ont été traitées par 1/4 de centimètre cube matin et soir par environ 50 000 unités par jour, soit par ingestion, soit par injection sous-cutanée. Aucun effet thérapeutique n'a pu être noté et les souris meurent dans le même temps que les témoins. Les germes isolés du sang du cœur sont restés parfaitement sensibles.

Or, deux heures après une injection sous-cutanée de 30 000 unités de colicine C3, le sérum titre en moyenne 50 unités/cm³, et trois heures après une injection sous-cutanée de 25 000 unités, les urines contenaient plus de 2 500 unités/cm³.

La colicine est donc loin d'être détruite *in vivo* et les taux humoraux observés ne sont pas en accord avec l'échec thérapeutique. A titre de comparaison, nous avons traité des souris infectées de la même manière avec 10 000 mg de chloramphénicol *per os* deux fois par jour. Au moment de la mort de tous les témoins, il y avait 75 p. 100 de survies, et le traitement fut interrompu. Toutes les souris survivantes moururent dans les cinq jours qui suivirent cet arrêt. Les germes réisolés étaient toujours sensibles au chloramphénicol. Il ne semble donc pas que cette infection expérimentale soit très favorable à l'étude de l'activité d'un produit.

Nous avons recherché si la colicine avait une action locale sur les germes intestinaux. Sur des animaux préalablement infectés *per os* avec la *Salmonella* sensible, l'ingestion de colicine ne détermine aucune diminution de ces germes dans les selles et dans des broyats de différentes parties de l'intestin. Les germes retrouvés ne sont pas résistants, mais la colicine ne peut être mise en évidence dans les broyats d'intestin des souris traitées.

En résumé, nous n'avons pas pu démontrer l'action *in vivo* sur *Salmonella enteritidis* d'une colicine particulière, bien que des taux humoraux importants aient été atteints.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Y. CHABBERT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 51.
- [2] P. FREDERICQ. *Rev. Belge Path. Med. exp.*, 1948, **49**, Suppl. IV.
- [3] S. P. HALBERT. *J. Bact.*, 1947, **54**, 26.
- [4] S. P. HALBERT et H. J. MAGNUSSON. *J. Immunol.*, 1948, **58**, 397.
- [5] N. G. HEATLEY et M. W. FLOREY. *Brit. J. exp. Path.*, 1946, **27**, 378.
- [6] A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 1040.

Bibliographie complète de la question des colicines dans :

R. DEPOUX. *Thèse Médecine*, Paris, 1952.

**TECHNIQUE SIMPLE D'ÉTUDE
DE LA MORPHOLOGIE DU B.K.
SOUS L'ACTION DES ANTIBIOTIQUES
CULTURES SUR LAMES ET COLORATION
PAR LA FUCHSINE TENSIO-ACTIVE**

par M^{lle} M. PEYRE et H. VELU (1).

(Laboratoires de Recherches Roussel-Sofrapen.)

Les techniques proposées pour l'essai *in vitro* des substances tuberculostatiques sont nombreuses ; elles utilisent soit des milieux liquides, soit des milieux solides, dans lesquels l'antibiotique est incorporé avant solidification ou par inondation de la surface, avec lecture suivant les cas sur la turbidité, l'examen des colonies, décelées au besoin par le tellurite, ou la recherche des microcolonies au moyen de frottis colorés.

Divers facteurs comme l'hétérogénéité des populations microbiennes qui assure la dissémination des éléments les moins sensibles et leur culture tardive [1, 2], le taux d'inoculum qui retentit directement sur l'activité bactériostatique [3], entraînent des divergences d'interprétation ou imposent des conditions expérimentales parfois difficiles à réaliser. C'est pourquoi, comme N. Rist [4] et E. Dissmann [5], nous avons donné la préférence à la technique des cultures sur lames de Pryce, préconisée après Jensen par Et. Bernard et Kreis.

Après des contacts discontinus ou un contact permanent de dix jours avec l'antibiotique en milieu de Dubos, les lames sont colorées par la méthode de Desbordes. La lecture est faite à l'immersion, soit par numération globale des colonies, soit par numération différentielle des grosses colonies (+++) comparables à celles des témoins, des petites colonies (++) et des colonies avortées ou des éléments isolés (+). On

(1) Avec le concours technique de M^{lle} Lacoste et M^{me} Dumas.

peut ainsi déterminer très facilement non seulement le nombre des microcolonies, leurs dimensions, mais encore les affinités tinctoriales, la morphologie des germes et, si l'on veut, suivre *in situ* leur développement.

Les tableaux I et II montrent les résultats de titrages comparatifs de streptomycine, de néomycine et de paraminosalicylate de soude, sur H 37 Rv, effectués par la technique des lames et par dilution en milieu de Dubos liquide.

TABLEAU I. — Comparaison des seuils sur lames et en Dubos liquide.

TECHNIQUES	STREPTOMYCINE	NÉOMYCINE	P. A. S. Na
Sur lames	0,1-0,5	6-8	0,5-1
Dilution classique en Dubos . .	0,05-0,1	4-6	10-25

TABLEAU II. — Détails des seuils sur lames.
Les signes — indiquent des dilutions qui n'ont pas été faites.

$\mu\text{g/cm}^3$	STREPTOMYCINE			NÉOMYCINE			P. A. S. Na		
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
0.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
0,025. . . .	71	83	104	—	—	—	—	—	—
0,05.	71	0	0	—	—	—	—	—	—
0,1.	15	0	0	—	—	—	8	—	—
0,5.	0	0	0	—	—	—	6	0	0
1.	0	0	0	—	—	—	0	0	0
2.	—	—	—	33	104	133	0	0	0
4.	—	—	—	94	116	24	—	—	—
6.	—	—	—	66	0	0	—	—	—

La comparaison montre l'identité des résultats donnés par les deux techniques pour la streptomycine et la néomycine et la discordance pour le PAS, qui souligne la difficulté du titrage de l'activité par culture homogène en milieu liquide, signalée par Youmans [3].

Un essai d'association de l'INH avec un antibiotique à l'étude, réalisé sur H 37 Rv, avec 3 contacts discontinus de six heures pendant trois jours, a donné après une durée totale de culture de dix jours, les résultats suivants, les chiffres indiquant le nombre total de colonies sans distinction de taille (tableau III).

Le transfert en milieu neuf, avec les précautions requises, des lames ayant séjourné dans des solutions antibiotiques, permet de contrôler l'action tuberculocide et de numérer les éléments résistants, plus ou moins altérés, qui, par leur multiplication tardive dans les titrages ordinaires, modifient les lectures et les interprétations.

TABLEAU III. — Association de l'antibiotique Sa. et de l'I.N.H.

Sa. $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ \ I.N.H. $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	0	2	4	8
0.	3'0	231	133	11
0,5.	110	6	1	0
1.	31	10	1	0
2.	1	0	0	0

La technique fournit par ailleurs un complément d'information très important : elle permet l'étude de la morphologie et de l'évolution des germes *in situ*, avec plus de sûreté et de facilité que les frottis de cultures solides ou liquides ou les tampons de coton qui servaient de support à Nedelkovitch ; des observations qui seront publiées ultérieurement nous ont ainsi permis de suivre la morphologie de H37 Rv au cours des divers stades de sa croissance et ses modifications pendant et après l'action des antibiotiques : la coloration des cultures sur lames met en évidence avec une netteté particulière les bacilles bleus qui ont conduit Hauduroy à conclure à l'existence d'un véritable « cycle tinctorial » dans l'évolution des mycobactéries, les granules de Much réétudiés par de nombreux observateurs, dont Nedelkovitch, Mudd et coll., leur formation, leur division, leur germination, ainsi que les divers types considérés comme des stades évolutifs : amas granulaires de Much et de Kahn ; zoogléas d'Alexander Jackson assimilables à des formes L d'après Klieneberger-Nobel [6] ; éléments mycéliens de Brieger et même les empreintes des germes morts ou lysés. L'addition de sérum entraîne la formation d'abord de palissades, puis de cordes à végétation exubérante.

Deux travaux récents ont montré *in situ*, au contraste de phase, en goutte pendante, des images absolument comparables à celles que nous avons obtenues avec des moyens techniques beaucoup plus simples : celui de Brieger et Glauert sur *Mycobact. avium* [7] et celui de Knaysi sur un paratuberculeux, *Mycobact. thamnophaeus* [8] ; ils éliminent l'hypothèse des artefacts de Porter et Yegian [9].

En résumé, la combinaison de la méthode des cultures sur lames et de la coloration à la fuchsine tensio-active doit permettre d'étudier facilement *in situ*, à l'immersion, en même temps que l'activité précise de substances tuberculostatiques ou tuberculocides et la sensibilité du B. K. aux antibiotiques, la morphologie et l'évolution des germes du bacille vers le granule ou réciproquement.

Elle nous a fourni, sur l'activité des produits purs ou associés, des renseignements précis, confirmés régulièrement par les essais sur le cobaye.

Nous n'avons rencontré qu'un seul ennui : l'inhibition parfois totale des germes par le blanc d'œufs déficients ayant servi à la fixation des cultures sur les lames.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. A. MITCHINSON. *Lancet*, 1952, **263**, 858.
- [2] G. L. HOBBY et T. F. LENERT. *Am. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 771.
- [3] G. P. YOUNG et coll. *J. Bact.*, 1947, **54**, 409.
- [4] N. RIST. Séminaire sur les Antibiotiques et la Médecine de l'Enfance, Paris, septembre 1952.
- [5] E. DISSMANN. Séminaire sur les Antibiotiques et la Médecine de l'Enfance, Paris, septembre 1952.
- [6] E. KLIENEGER-NOBEL. *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 77.
- [7] E. M. BRIEGER et A. M. GLAUERT. *J. gener. Microb.*, 1952, **7**, 287.
- [8] G. KNAYS. *J. Bact.*, 1952, **64**, 859.
- [9] K. R. PORTER et D. YEGIAN. *J. Bact.*, 1945, **50**, 563.

SENSIBILITÉ ET RÉSISTANCE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* VAR. *HOMINIS* A L'ISONIAZIDE

ÉTUDE DE 322 SOUCHES ISOLÉES CHEZ DES TUBERCULEUX ACTION *IN VITRO* DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES

par J. VIALIER, H. SERRE et R.-M. CAYRÉ.

(*Institut Bactériologique de Lyon.*)

Nous avons étudié l'action exercée *in vitro* par l'isoniazide sur 322 souches de bacilles isolées de l'expectoration ou de liquides céphalo-rachidiens de tuberculeux ; 206 provenaient de sujets traités par l'isoniazide. Deux cent trente-trois souches ont été isolées par culture sur milieu de Löwenstein ou milieu liquide de Dubos, selon la technique habituelle. Le produit pathologique est traité par l'acide sulfurique à 15 p. 100 durant quatre minutes, puis lavé trois fois avant ensemencement. Soixante et une souches ont été isolées par culture à partir du ganglion lombaire de cobayes inoculés avec le produit. La sensibilité à l'isoniazide a toujours été recherchée en milieu liquide de Youmans-sérum de cheval, l'ensemencement effectué avec des quantités équivalentes de bacilles à partir d'une culture de quinze à vingt jours en milieu de Dubos liquide. La lecture a été réalisée après un séjour de quinze jours à l'étuve à 37°. Nous n'avons tenu compte que des tubes ayant poussé macroscopiquement.

Au début, nous avons limité cette recherche à une zone de concentration d'isoniazide comprise entre 0.05 et 10 µg par centimètre cube. Nous l'avons ensuite poursuivie au delà de 20 µg. au fur et à mesure de l'apparition de bacilles plus résistants. Dans les conditions de notre expérimentation, la croissance de la souche H 37 Rv est inhibée par une concentration du milieu de culture en isoniazide voisine de 0,05 µg par centimètre cube.

Dans des essais antérieurs concernant [1] 88 souches de bacilles tuberculeux ou paratuberculeux, nous avons utilisé alternativement, puis comparativement, le milieu de Dubos et le milieu de Youmans-sérum de cheval. Le milieu de Dubos nous a paru favoriser nettement la croissance du bacille, surtout après le trentième jour où apparaissent dans les tubes de concentration de plus en plus élevée en isoniazide, des individus moins sensibles. La dose minimum inhibant toute croissance nous a paru toujours plus faible si la recherche est effectuée en milieu de Youmans, ceci surtout si la lecture est faite tardivement. Nous n'ignorons pas les reproches faits au milieu de Youmans [2] ; nous pensons pourtant avoir réduit au minimum les causes d'erreur et que tous nos résultats sont comparables. A l'inverse du milieu de Dubos, le milieu de Youmans permet en outre d'apprécier facilement, du moins d'une façon approximative, l'abondance des colonies et de comparer les milieux témoins aux milieux renfermant l'antibiotique.

Le tableau suivant indique la sensibilité à l'isoniazide de 295 souches de bacilles isolés de l'expectoration de tuberculeux pulmonaires. Nous les avons classées par ordre de sensibilité décroissante et d'après la quantité d'antibiotique reçue par le sujet au moment du prélèvement.

QUANTITÉ d'isoniazide en grammes reçue avant le prélèvement	SENSIBILITÉ DES BACILLES exprimée en μg d'isoniazide par centimètre cube							TOTAL
	0,05	0,1	0,5	1	5	10	20	
0	59	25	4	1				89
0 à 1	7	4						8
1 à 5	10	8	6	1			2	27
5 à 10	6	9	8	5	1	1		30
10 à 20	7	10	4	3	4	5	5	38
20 à 30	6	11	2	2	3	1	10	39
30 à 40	6	3	3	4	8		3	27
40 à 50	3		2		5	4	3	17
50 à 60	2	3	2		2			13
Au-dessus de 60	2		2	3			2	7

Quatre-vingt-quatre souches isolées de sujets n'ayant jamais reçu de médicament et 27 souches recueillies à partir de L. C.-R. de méningites non traitées se sont montrées parfaitement sensibles à l'isoniazide puisqu'une concentration de 0,1 μg par centimètre cube inhibait toute croissance ; une concentration en isoniazide de 0,05 μg par centimètre cube inhibait la croissance de la plupart des souches. Quelques-unes de ces souches étaient hautement résistantes à la streptomycine, en particulier une souche isolée d'un L. C.-R. Cinq souches étaient moins sensibles, 4 avaient leur croissance inhibée par une concentration en isoniazide inférieure à 0,5 μg ; une seule poussait légèrement à cette concentration. Certaines souches ont une sensibilité initiale à l'isoniazide moins bonne, mais le produit exerce sur elles une action bactériostatique prononcée à la concentration de 0,5 μg . Cette sensibilité de *M. tuberculosis hominis* à l'antibiotique

s'oppose à l'insensibilité de la plupart des souches de *Mycobactéries* non pathogènes, du moins à des concentrations inférieures à 20 μg . Dans 2 cas, nous avons isolé par tubage gastrique chez 2 enfants non traités des *Mycobactéries* acido-alcoolo-résistantes dont la croissance n'était pas entravée par une concentration de 20 μg par centimètre cube d'isoniazide. L'inoculation ne tuberculisa pas l'animal et nous les fit considérer comme des *Mycobactéries* non pathogènes recueillies dans les mucosités gastriques.

Tous les bacilles résistant à l'isoniazide à un taux supérieur à 1 μg par centimètre cube provenaient de sujets traités par le produit. Six poussaient dans des milieux contenant 20 μg par centimètre cube d'isoniazide ; 2 de ces souches donnaient encore quelques colonies malgré une concentration de 40 μg par centimètre cube : toutes deux étaient sensibles à 50 μg .

L'étude de la morphologie et des affinités tinctoriales de quelques-uns de ces bacilles isoniazido-résistants ne nous a pas montré de divergences appréciables. L'aspect des colonies, l'acido-alcoolo-résistance ne nous ont pas paru modifiés. Il en va de même de l'affinité pour le rouge neutre. Ces bacilles se colorent en rouge comme les *Mycobactéries* pathogènes. La croissance en milieu contenant de l'isoniazide des souches résistantes à plus de 1 μg a toujours été superposable à celle en milieu témoin. L'abondance des colonies en milieu témoin a été équivalente, ou supérieure. Nous n'avons jamais observé jusqu'alors de dépendance relative ou d'exigence à l'isoniazide. Très fréquemment, le nombre de colonies développées dans les milieux les plus riches en isoniazide est bien inférieur à celui observé dans les témoins. C'est l'indication d'une différence de sensibilité des différents éléments de la population bacillaire ensemencée. Lorsque l'isolement de la souche à partir du produit pathologique est fait sur milieu solide, il est nécessaire — comme cela est classique pour les autres antibiotiques — de prélever le plus grand nombre possible de colonies isolées afin d'avoir une sensibilité globale de la souche, le chiffre obtenu indiquant seulement la sensibilité des bacilles les plus résistants. Nous avons effectué des cultures à partir de 32 colonies concernant 10 souches isolées sur milieu de Löwenstein. Cinq souches, provenant de malades traités, avaient une sensibilité globale à 0,05 μg par centimètre cube. Douze cultures de colonies isolées ne nous ont pas donné de divergence notable de la sensibilité, une seule colonie ayant une sensibilité à 0,1 μg par centimètre cube. Cinq autres souches provenant aussi de malades traités avaient une sensibilité globale supérieure à 0,5 μg . Quelques-unes parmi les 20 colonies testées avaient des sensibilités divergentes, de 0,05 à 1 μg par exemple dans un cas, de 1 à 10 μg dans l'autre. Nous retrouvons là des divergences superposables à celles notées pour la streptomycine et le PAS.

Soixante et une souches ont été isolées à partir du ganglion lombaire du cobaye tuberculisé par l'injection du produit pathologique. La plupart de ces souches se sont révélées sensibles à l'isoniazide à un taux inférieur à 1 μg ; une n'était pas sensible à 5 μg d'isoniazide. Nous ne pouvons indiquer encore exactement l'influence du passage par l'organisme du cobaye sur les souches résistantes. Dans un seul cas, nous avons obtenu une divergence nette, la souche isolée par culture directe sur milieu de Löwenstein, à partir de mucosités

recueillies par tubage gastrique chez un enfant traité par l'isoniazide, s'est montrée insensible à cet antibiotique à une concentration de 10 μg par centimètre cube, alors que la souche isolée du ganglion de cobaye était sensible à une concentration de 0,5 μg par centimètre cube.

Pour 20 souches, la sensibilité a été testée à deux reprises séparées par un intervalle de temps variable de quinze à quatre-vingt-dix jours. Nous nous sommes servi pour l'ensemencement de la culture originelle en milieu de Dubos, utilisée pour la première recherche de la sensibilité. Pour 7 souches, un intervalle de plus de quatre-vingt-dix jours séparait les deux recherches. Dans les conditions où nous nous sommes placés, seize fois le chiffre de la sensibilité s'est trouvé identique dans les deux épreuves. Dans 3 cas nous avons eu, lors de la deuxième recherche, une diminution légère de la résistance portant sur un seul tube ; dans un cas, le chiffre de la résistance fut au contraire trouvé plus élevé (de 5 à 10 μg).

Nous avons étudié l'action exercée par l'association streptomycine-isoniazide sur la croissance *in vitro* de 16 souches de bacilles, peu sensibles ou non sensibles dans les limites normales à l'un ou à l'autre de ces deux antibiotiques. Le mélange des deux antibiotiques correspondait à 30 d'isoniazide pour 100 de dihydrostreptomycine. L'association *in vitro* n'a jamais été défavorable, agissant comme l'antibiotique le plus actif. Dans 3 cas seulement, l'association streptomycine-isoniazide s'est montrée légèrement plus efficace que l'antibiotique le plus actif employé isolément. Il s'agissait là de souches peu sensibles à la fois à la streptomycine et à l'isoniazide et nous pensons que cette action favorisante est due à la sensibilité divergente des bacilles à chacun des deux antibiotiques [3].

De même nous avons étudié l'action de l'association PAS-isoniazide [4]. M^{me} Aitoff [5], M. Coletsos [6] ont signalé l'existence d'une synergie d'action entre les deux antibiotiques. Nous avons voulu chercher si l'association de PAS à un taux inférieur au taux bactériostatique à l'isoniazide pouvait permettre à ce dernier d'exercer une action sur des souches peu ou non sensibles par suite d'une résistance acquise : 18 souches ont été utilisées, 8 avaient une sensibilité inférieure à 10 μg par centimètre cube ; pour 8 autres, elle était comprise entre 1 et 10 μg . 2 souches enfin avaient leur croissance totalement inhibée par une concentration d'isoniazide de 1 μg par centimètre cube. Le PAS a été employé aux concentrations de 0,05, 0,01, 0,2 μg par centimètre cube et la sensibilité à l'isoniazide recherchée dans une zone allant de 0,05 à 20 μg . Pour les bacilles fortement résistants à l'isoniazide, l'adjonction de PAS au milieu de culture n'a eu aucune influence sur la croissance de 5 souches poussant normalement, malgré une concentration d'isoniazide de 20 μg par centimètre cube.

Pour 3 souches dont la sensibilité était comprise entre 10 et 20 μg , il n'a été noté aucune action pour l'une d'elle et une action légère pour les 2 autres, la concentration maxima d'isoniazide permettant le développement passant de 10 à 5 μg pour des concentrations en PAS de 0,1 ou 0,02 μg .

Pour les 10 autres souches, à sensibilité diminuée, les résultats ont été variables. La concentration minima d'isoniazide empêchant toute croissance bacillaire, a été abaissée dans quelques cas par l'adjonction de PAS au milieu, mais non d'une façon régulière et systématique,

l'abondance des colonies étant diminuée dans les tubes contenant l'association PAS-isoniazide par rapport aux tubes témoins ne contenant que du PAS.

L'association PAS-isoniazide, en somme, n'exerce *in vitro*, sur des souches peu ou non sensibles à l'isoniazide, qu'une action restreinte, elle ne rend pas sensible à l'isoniazide les souches qui ont acquis une résistance importante.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BRUN et J. VIALIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1332.
- [2] J. COLETOS. *Ces Annales*, 1952, **83**, 491.
- [3] J. VIALIER et J. TIGAUD. *Soc. Biol. Réunion de Lyon*, 17 novembre 1952.
- [4] J. VIALIER et M^{lle} R.-M. CAYRÉ. *Soc. Biol. Réunion de Lyon*, 19 janvier 1953.
- [5] AÏTOFF (M^{me}). *Ces Annales*, 1952, **83**, 130.
- [6] COLETOS. *Rev. Tuberc.*, 1952, **16**, 670.

PROPRIÉTÉS DU FILTRAT DES CULTURES DU BACILLE DE KOCH : ANTIBIOTISME ET CYTONOCIVITÉ. PRÉCISIONS SUR LA SATURATION DES PHAGOCYTES

par L. DUCHON.

(Laboratoire de secteur. Hôpital Trousseau.)

Cette évocation de la toxicité des cultures du bacille de Koch, en dehors des corps microbiens, n'est pas sans quelque appréhension pour nous. Ce micro-organisme ne donne pas de toxine, c'est là conception dogmatique.

Nous demandons alors comment interpréter les chiffres de ce tableau, témoignage d'une longue observation.

Chaque chiffre de ce tableau est la résultante des richesses culturelles de 4 tubes de 1 cm³ de sang défibriné, tous tubes préparés et soumis aux conditions de la méthode d'étude et de mesure du conflit cellules microorganismes [4].

(4 tubes pour augmenter la précision.)

Ces chiffres expriment :

1° Un résultat témoin : tubes ayant reçu une goutte de suspension microbienne.

2° 4 ou 5 résultats de tubes ayant reçu par groupe une goutte d'une dilution de filtrat de culture, sur bougie L5, d'un bacille de Koch, fraîchement isolé, en bouillon glyciné, âgée de 2 mois environ, dilution préparée avec la même suspension microbienne, soit ici *Streptococcus hemolyticus* aux titres.

10⁻³, 10⁻⁵, 10⁻⁷, 10⁻⁹, 10⁻¹¹.

	TÉMOIN	FILTRAT DILUÉ A					PÉNICILLINE 1:30 000	INDICES	
		10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹	10 ⁻¹¹		St ^H	Sta ^a
1. Br..., BK +	12 480	11 480	11 280		10 320	11 680	8 800	15	10
2. Ma..., BK +	12 100	10 480	10 800		11 200	13 100	7 040	6	38
3. Cer...	3 400	3 380	3 160	3 500	3 720	3 840	1 000	150	248
4. Ba...	8 320	8 400	8 800	9 120	9 680	10 720	8 320	28	124
5. Bro..., BK +	6 640	5 760	5 520	5 840	5 420	5 840	6 400	3	41
6. Le... (1)...	1 540	1 520	1 800	2 110	1 710	1 600	1 440	3 240	6 480
7. Ma...	1 560	1 920	1 880	2 160	2 160	1 720	5 440	162	77
8. Ce..., BK +	5 120	4 000	4 320	4 640	5 120	6 320	11 200	17	15
9. Gu... (1)...	2 720	2 140	2 240	2 580	2 800	2 980	300	5 280	12 000
10. Mar... (1)...	4 880	4 050	4 800	4 660	4 640	5 120	400	4 800	4 800
11. Cu...	7 120	7 780	7 410	8 080	8 000	8 000	2 880	15	168
12. Cal..., BK +	8 080	7 280	6 480	7 120	7 320	6 780	2 880	30	60
13. Has... (1)...	1 800	1 145	1 160	1 380	2 960	2 000	12	19 800	110 400

(1) Ces sangs (indices exclus) sont restés de deux heures à quatre heures de plus à l'étuve.

3° Le résultat conjoint d'un groupe de tubes ayant reçu une goutte d'une dilution de pénicilline à 1:30.000 préparée dans les mêmes conditions.

4° Les indices d'activité cellulaire de chaque sang.

Ces sangs comportent des sangs de donneurs non tuberculeux et de donneurs atteints de tuberculose pulmonaire cavitaire, cracheurs de bacilles.

OBSERVATION. — A. — Constatons tout d'abord que lorsqu'on ajoute aux sangs des tuberculeux la dilution de filtrat même jusqu'aux titres les plus faibles, les chiffres des tubes d'observation s'inscrivent sur une courbe presque toujours *sous-jacente* à la ligne témoin pratiquement horizontale (suivant notre diagramme : richesses culturales en ordonnée, titres des dilutions en abscisse [2]).

Cette courbe révèle donc manifestement une activité bactéricide.

Toutes proportions gardées, ces tubes d'observation se comportent exactement comme ceux des sangs antibiotisés récemment par la pénicilline (première phase) lorsqu'ils sont soumis dans les mêmes conditions à des doses identiques de cet antibiotique [3].

Comme pour la pénicilline, cette observation, à notre sens, ne se comprend que par la présence d'une certaine quantité de toxine dans le sang, à laquelle vient se surajouter la quantité importée lors de l'expérience : la courbe sous-jacente au témoin accuse la propriété antibiotique du filtrat. Nous ne trouvons pas d'autre explication. Propriété qui paraît confirmée par ce qui suit.

B. — En opposition, remarquons, en effet, que les sangs des donneurs non tuberculeux, présentant des indices d'activité cellulaire faibles analogues à ceux des tuberculeux, se comportent tout différemment.

Les chiffres des tubes en observation s'inscrivent sur une courbe

sus-jacente à la ligne des témoins : ici, le filtrat, d'une part ne se surajoutant pas à la présence préalable de la toxine antibiotique, d'autre part ne pouvant être concentré [4] par la cellule inactive jusqu'à une teneur nocive pour le streptocoque phagocyté, parfait seulement l'inhibition cellulaire, d'où disparition de l'activité cellulaire restante par cytonocivité.

L'antibiotisme du filtrat (1), trop peu puissant aux doses fortes, n'apparaît pas brutal comme celui de la pénicilline, tout au moins pénicilline fraîche ; une pénicilline vieillie perdant son activité antibiotique a tendance, au contraire, au fur et à mesure de son vieillissement, à donner une courbe analogue [2] avec de tels sangs.

C. — Remarquons maintenant le moyen terme : un sang doué d'une grande activité cellulaire, témoignée par les indices élevés, est capable d'absorber, de concentrer la toxine en élevant intracellulairement sa teneur et nous retrouvons son antibiotisme aux doses fortes, sa cytonocivité aux doses faibles, et tout cela généralement en fonction de la qualité du sang.

[A l'abri de toutes causes d'erreur (pH ou facteur de croissance de la glycérine du filtrat) l'antibiotisme de ce filtrat, sur milieu inerte, se révèle sans grande difficulté. Son activité, variable d'une souche à l'autre est, quoique peu brutale, perceptible même à faible dose et reste très stable (même après plusieurs années de séjour à l'étuve)].

Ainsi donc le filtrat de culture en bouillon glycérimé du B. K. nous apparaît une pénicilline au petit pied ; comme elle, doué d'une propriété antibiotique ; comme elle, doué d'une propriété cytonocive [2].

Antibiotisme qui n'apparaît pas tellement étrange si l'on réfléchit aux infections secondes chez les tuberculeux. De fait, les infections secondes du tuberculeux sont rarissimes : pas d'escarre de décubitus, pas d'infections cutanées quel que soit le degré de cachexie, rareté des infections rhino-pharyngées communes malgré les conditions si propices à leur éclosion (exposition prolongée à l'aération des salles, quelle que soit la température de l'atmosphère et possibilité de neutralisation dans de telles conditions de la barrière phagocytaire rhino-pharyngée, la cellule exposée au froid restant parfaitement inactive [5]). Pas d'infections secondes des excavations pulmonaires, fait si surprenant et témoigné bien souvent par l'absence ou la pauvreté de la flore des expectorations en dehors du B. K. Abscès froids qui même déhiscent ne se réchauffent pas. Enfin, urines « aseptiques » du rein tuberculeux.

★ ★

Si nous avons confronté ici une dilution de pénicilline au titre 1 : 30 000, c'est dans le but de rendre cette expérimentation encore plus parlante.

Constatons, en effet, qu'il y a une relation étroite dans le domaine

(1) D'aucuns pourraient faire intervenir la possibilité de la présence dans le filtrat de produits éventuellement nocifs pour les micro-organismes, en provenance de la désintégration du seul milieu glycérimé. Nous ne le pensons pas en raison surtout de l'accusation ici de la présence préalable *in vivo* de la propriété antibiotique dans le sang.

de la saturation cellulaire [4] entre la pénicilline et la toxine du bacille de Koch.

a) *Sangs de tuberculeux*. — Inactivité cellulaire subtotale témoignée par les indices.

Or, la pénicilline n'est pas ou peu absorbée par les cellules, le chiffre des tubes à pénicilline reste élevé, voisin de celui du témoin, la cellule étant saturée *in vivo* par la toxine circulante.

L'adjonction d'une trace de filtrat, lors de l'expérience A, produit la différence vis-à-vis du témoin, soit par ce qui subsiste faiblement du pouvoir de concentration, soit par simple addition.

b) *Sangs de non tuberculeux*. — 1° Indice cellulaire faible.

L'inactivité cellulaire se traduit encore ici par le chiffre élevé des tubes à pénicilline, chiffre toujours plus ou moins voisin de celui du témoin. Chiffre exprimant encore la saturation cellulaire préalable par une cause souvent connue (sur ce tableau tous les donneurs, à l'exception des n°s 9 et 13 avaient reçu des antibiotiques dans un passé plus ou moins lointain), parfois indéterminée.

De même, la concentration cellulaire du filtrat antibiotique ajouté ne pouvant se réaliser normalement, sa teneur intracellulaire est trop faible pour une activité nocive vis-à-vis des micro-organismes phagocytés, il ne fait que parfaire la saturation de la cellule, ce qui explique la courbe sus-jacente au témoin de l'expérience B.

2° Indice cellulaire élevé.

Pour ces sangs à grande activité cellulaire, la cellule non saturée, quasiment dans un état de viduité plus ou moins prononcé, joue son rôle normal : elle capte, concentre, fixe [3] le corps toxique circulant.

Avec les tubes à pénicilline, nous observons donc des chiffres bas, parfois très bas.

Avec le filtrat antibiotique du B. K. la cellule concentrant dans les mêmes conditions et suivant la qualité du sang, la courbe suit un certain parallélisme avec celle de la pénicilline : antibiotisme tout comme cette dernière aux doses fortes, cytonocivité tout comme cette dernière aux doses faibles [2].

En résumé, la méthode d'étude et de mesure du conflit cellules micro-organismes révèle que le filtrat des cultures du bacille de Koch en bouillon glyciné est doué de propriétés antibiotiques et cytonocives. Les effets de ces propriétés sur les phagocytes, étudiés conjointement avec les effets de la pénicilline permettent de préciser le phénomène de la saturation cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 228 ; **83**, 384.
- [2] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 655.
- [3] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1953, **84**, 458.
- [4] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1953, **84**, 461.
- [5] L. DUCHON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 221.

ESSAI SUR LA SYSTÉMATIQUE DU GENRE *ACHROMOBACTER*

par J. BRISOU.

(Ecole d'Application des Médecins de la Marine.
Hôpital Sainte-Anne. Toulon.)

Etant donné, d'une part, l'intérêt médical et épidémiologique des espèces du genre *Achromobacter* Bergey et al. qu'on trouve couramment dans les eaux, dans les mollusques comestibles et dans de nombreux produits pathologiques ; étant donné, d'autre part, les difficultés très grandes que les bactériologistes éprouvent à les déterminer et surtout à en situer la position systématique par rapport aux très nombreuses espèces des genres voisins (en particulier *Alcaligenes*), il nous a semblé utile d'en proposer une méthode de détermination et d'en discuter la position systématique.

Essayons tout d'abord de situer le problème et avant tout de mettre en lumière les divergences qui existent entre les deux classifications actuellement en usage. La systématique du Bergey's Manual de 1948 définit et situe ainsi le genre *Achromobacter* : « Bâtonnets asporulés, non pigmentés sur gélose ou gélatine, mobiles par cils péritriches ou immobiles, Gram-négatifs, vivant dans les eaux et les sols. » Il constitue le deuxième genre de la famille des *Achromobacteriaceae* Breed. Son espèce-type est *A. liquefaciens*, et il comprend en tout 12 espèces dont la clef repose sur la mobilité, l'attaque de la gélatine, la réduction des nitrates et l'action sur le lait. Pour Magrou et Prévot [9], au contraire, le genre *Achromobacter*, qui a la même définition que celle du Bergey's Manual, est le genre I de la tribu des *Achromobactereae* M. et P. 1948 définie : « *Pseudomonadaceae* incolores, non pathogènes pour les plantes » et comprenant 2 genres *Achromobacter* et *Mycoplana*. Ainsi la divergence essentielle entre la classification américaine et la classification française est que le genre *Achromobacter* est pour la première une *Achromobacteriaceae* et pour la seconde une *Pseudomonadaceae*. Kauffmann et al., dont les travaux sur ces bactéries sont considérables, rangent le genre *Achromobacter* parmi les Entérobacteriacées, car, à côté des deux habitats principaux : sol et eaux, on les trouve aussi dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Toutefois, les Entérobacteriacées vraies poussent beaucoup mieux à 37° qu'à la température ordinaire (beaucoup même ne poussent pas ou presque pas à température ordinaire), tandis que les *Pseudomonadacées*, et en particulier *Achromobacter*, poussent aussi bien à la température ordinaire qu'à 37°.

Ayant eu l'occasion d'isoler de nombreuses souches d'*Achromobacter*, nous avons pu en établir une méthode de détermination.

I. Le diagnostic du genre repose sur la mise en évidence des caractères de sa définition et sur l'impossibilité de l'identifier à un genre

de la famille des Entérobacteriacées. Le diagnostic de l'espèce se fait par les caractères de mobilité M, de réduction des nitrates N, de liquéfaction de la gélatine G+, ou d'immobilité I; et enfin d'habitat marin T. Nous avons ainsi les 5 groupes :

1° MN (mobiles ; nitrates réduits) subdivisé en :

G + comprenant *A. iophagum*, *A. delicatulum*, *A. hyalinum* et *A. liquidum*.

G — comprenant *A. cyclocaster*, *A. germinum*, *A. sewerini*, *A. reticulareae*, *A. pinatum* et *A. pestifer* (identique à *A. aquamarinus*).

2° M (mobiles ; nitrates non réduits) subdivisé en :

G + comprenant *A. liquefaciens* et *A. litoralis*.

G — comprenant *A. superficiale*, *A. hartlebii*, *A. guttatum*, *A. venenosum*, *A. viscosymbioticum*, *A. ravenelii*, *A. pikowskyi*, *A. alcoliarmaticum*, *A. inunctum*.

3° IN (immobiles ; nitrates réduits) subdivisés en :

G + comprenant exclusivement des espèces marines.

G — comprenant *A. delmarvae* et *A. ubiquitum*.

4° I (immobiles ; nitrates non réduits) subdivisés en :

G + comprenant *A. butyri*.

G — comprenant *A. eurydice* et une dizaine d'espèces insuffisamment décrites.

5° T : espèces strictement marines (Zobell et Upham 1944) comprenant *A. thalassius*, *A. aquamarinus*, *A. stationis* et *A. stenohalis*, cultivant mal ou pas du tout sur les milieux à l'eau douce.

II. Formes affines.

Nous rapprochons du genre *Achromobacter* pour des raisons écologiques et biologiques, les espèces :

B. anitratum Schaub et Hauber [1].

Moraxella lwoffii Audureau [3] et les variétés glucidolytiques de Piéchaud [4] et al.

B5W Stuart [2].

Neisseria winogradskyi Lemoigne et al. [5] qui se comporte comme un *Achromobacter* [6].

III. Positions respectives des genres *Achromobacter* et *Alcaligenes*.

La définition du genre *Alcaligenes* Castellani et Chalmers a été adoptée sans modification, aussi bien par Bergey et al. que par Prévot. Toutefois dans la classification américaine, ce genre est le premier de la famille des *Achromobacteriaceae*, alors que dans la classification française, il est le quatrième genre de la tribu des *Salmonelleae*, troisième tribu de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Il nous apparaît que les espèces groupées respectivement dans ces deux genres sont très voisines et qu'il y aurait intérêt à les rapprocher dans la systématique soit en incorporant purement et simplement les espèces du genre *Alcaligenes* dans le genre *Achromobacter*, ce qui supprimerait ce genre superflu, soit en le considérant comme un sous-genre d'*Achromobacter*. Cette conception permet d'éviter le passage par la tribu des *Mimeae* proposée par W.-H. Ewing [7]. Les formes filamenteuses mises en évidence par Lwoff [8] plaident en faveur de cette conception.

CONCLUSIONS. — 1° Le genre *Achromobacter*, famille des *Pseudomonadaceae*, renferme de nombreuses espèces d'intérêt médical et

épidémiologique dont une méthode de détermination biochimique est proposée en attendant qu'une classification sérologique puisse être établie.

2° Le rattachement de *B. anitratum*, de B5W et de germes voisins au genre *Achromobacter* est proposé.

3° Le genre *Alcaligenes* est très voisin, sinon identique au genre *Achromobacter* ; il y aurait intérêt à les réunir ou à considérer le premier comme un sous-genre du second.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SCHAUB et HAUBER. *J. Bact.*, 1949, **57**, 659.
- [2] STUART, FORMAL et MC GANN. *J. inf. Dis.*, 1949, **84**, 235.
- [3] A. AUDUREAU. *Ces Annales*, 1949, **64**, 126.
- [4] D. et M. PIÉCHAUD et L. SECOND. *Ces Annales*, 1951, **80**, 97.
- [5] LEMOIGNE, H. GIRARD et G. JACOBELLI. *Ces Annales*, 1952, **82**, 389.
- [6] J. BRISOU et MORICHAU-BEAUCHANT. *Ces Annales*, 1952, **82**, 640.
- [7] W. H. EWING. *J. inf. Dis.*, 1948, **56**, 373.
- [8] A. LWOFF et H. IONESCO. *Ces Annales*, 1950, **79**, 14.
- [9] J. MAGROU et A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1948, **75**, 99.

MIMEAE ET FORMES COURTES DES BACTÉRIES

par J. BRISOU, J. MORICHAU-BEAUCHANT et J. GIMENEZ.

(Ecole d'Application des Médecins de la Marine. Toulon.)

Il n'y a pas lieu de s'étendre ici sur la variabilité morphologique des microbes, qui est une notion courante de microbiologie générale. Cependant une observation récente va nous permettre une discussion de la tribu des *Mimeae* proposée en 1942 par de Bord [1, 2].

Il y a quelques semaines, un nourrisson de 3 mois venait mourir à l'Hôpital Sainte-Anne d'une toxicose consécutive à une otite aiguë. Dans le liquide céphalo-rachidien on observait un germe Gram négatif, très court, que l'on pouvait prendre à première vue pour une *Neisseria*. En examinant plus attentivement les préparations, on rencontrait, çà et là, des ébauches de forme bacillaire. Certains éléments enfin étaient difficiles à décolorer par l'alcool et restaient un peu teintés par le Gram.

Des ensemencements pratiqués sur gélose ascite, gélose au sang et gélose ordinaire, permirent l'isolement rapide d'un germe très court, Gram négatif, avec de rares éléments bacillaires, fortement hémolytique. Ce germe cultivait aussi bien, sinon mieux, sur les milieux ordinaires que sur les géloses enrichies.

Les épreuves biochimiques montrèrent que cette bactérie n'était autre qu'un coliforme, intermédiaire entre les *Escherichia* et les *Klebsiella*. Nous nous arrêtons donc provisoirement à l'étiquette « *Intermediate* ».

La souche fut adressée à M. Henriksen d'Oslo, pour étude sérologique. Testé vis-à-vis de 14 sérums type Kauffmann et 27 de Brooke, le germe fut identifié au type capsulaire II des *Klebsiella* (1).

Il s'agissait donc indiscutablement d'une *Klebsiella*.

Des cultures en milieu privé de potassium, selon la technique de Lwoff [3] et en milieu pénicilliné, firent apparaître des formes longues, filamenteuses et des formes bacillaires normales.

Cette observation, particulièrement démonstrative, apporte une confirmation aux recherches poursuivies par Henriksen au sujet des *Moraxella* et des *Mimeae*, elle renforcera, en outre, la position que nous avons déjà prise en 1952 à propos de *Moraxella lwoffii* [4].

Dans un travail récent, Henriksen [5] montre que la tribu des *Mimeae* ne semble pas indispensable. En effet :

Mima polymorpha est identique à *Moraxella duplex*.

Herellea n'est autre que *B. anitratum*, connu également sous le nom de B5W, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*. (D. et D. Piéchaud. L. Second.)

Colloïdes donne les mêmes réactions biochimiques qu'*Escherichia freundii*.

Si nous avons adopté le point de vue de de Bord, nous eussions classé notre bactérie glucidolytique et gazogène dans la tribu des *Mimeae*, genre *Colloïdes*. L'expérience a montré qu'il s'agissait plus simplement d'une forme courte de *Klebsiella*.

En donnant trop de poids à la morphologie, on arrive à la confusion qui commence à régner en ce moment à propos des *Neisseria* et des *Moraxella*.

Parmi les espèces décrites on rencontre des souches glucidolytiques et des souches sans action sur les sucres ; des variétés gazogènes, des hémolytiques ; certaines sont pathogènes, d'autres saprophytes, etc. Les essais de systématisation sérologique sont tout aussi difficiles. On s'interroge même pour savoir où placer les *Moraxella* authentiques.

Il faut penser que, dans chaque espèce microbienne, il existe des formes coccoïdes, très courtes, plus fréquentes peut-être qu'autrefois, pour des raisons qui nous échappent en partie ; il est inutile d'encombrer les systématiques de tribus et d'espèces nouvelles. Il y a des formes courtes, comme il existe des formes « L » si bien étudiées par Klieneberger-Nobel et par Tulasne.

Ainsi que nous l'avons déjà soutenu [4], *Moraxella lwoffii* n'est autre qu'une forme coccoïde soit d'*Alcaligenes*, soit d'un *Achromobacter*, selon son action sur les sucres, le lait, la gélatine et les nitrates.

Les *Moraxella*, si l'on accepte cette façon de voir, pourraient être avantageusement réduites aux espèces parasites obligatoires ou même à l'espèce sérophile.

Nous ne pouvons que confirmer et appuyer l'opinion émise par Henriksen au sujet des *Mimeae* [5, 6], tribu superflue dont on peut fort bien se passer, et nous estimons que le germe *Moraxella* a été trop élargi.

(1) Nous remercions vivement M. le Dr S. D. Henriksen de sa précieuse collaboration. Cette détermination sérologique apporte un argument de grande valeur à notre thèse.

En conclusion. — Toutes les espèces microbiennes peuvent, à un moment donné, épouser la forme coccoïde. Cette morphologie assez singulière ne modifie en rien les caractères biochimiques et antigéniques du germe. Il est toujours possible de faire entrer ces formes courtes dans des genres ou espèces déjà décrits.

On en donne ici un exemple typique à propos d'une *Klebsiella* isolée d'un liquide céphalo-rachidien purulent.

Cette observation confirme la position prise par Henriksen et par nous-même au sujet des germes décrits depuis plusieurs années sous les noms de : *B. anitratum*, *Moraxella lwoffi*, *Moraxella lwoffi* var. *glucidolytica*, *Mima*, *Herellea*, *Colloïdes* qui, en fait, sont des épithètes inutiles. Tous ces germes de forme courte, Gram négatifs, peuvent être reclassés correctement dans des genres ou espèces déjà connus comme *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, etc., dont ils ne sont, en fait, que des variantes morphologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DE BORD. *Iow. State. Coll. J. Sci.*, 1942, **16**, 471.
- [2] DE BORD. *J. Lab. Clin. Med.*, 1943, **28**, 710.
- [3] A. LWOFF et H. IONESCO. *Ces Annales*, 1950, **79**, 14.
- [4] J. BRISOU et J. MORICHAU-BEAUCHANT. *Ces Annales*, 1952, **82**, 640.
- [5] S. D. HENRIKSEN. *J. gen. Microb.*, 1952, **6**, 318.
- [6] S. D. HENRIKSEN. Correspondance personnelle.

MESURE DES POUVOIRS AMYLOLYTIQUE ET PROTÉOLYTIQUE DES TERRES EN AÉROBIOSE

par M.-A. CHALVIGNAC.

(*Institut Pasteur. Microbie technique.*
Laboratoire de Microbiologie du Sol.)

Poursuivant l'étude des processus de dégradation des substances organiques dans le sol, il nous a été possible de préciser la nature des groupements physiologiques microbiens (les « flores zymogènes » selon la terminologie de Winogradsky) correspondant à la protéolyse et à l'amyolyse [1, 2].

Nous nous étions placé dans des conditions aussi écologiques que possible.

En ce qui concerne l'amyolyse, à partir de terres enrichies en amidon ou de grains de blé désinfectés ensemencés avec de la terre, nous avons pu isoler un certain nombre de souches. L'étude de celles-ci nous avait permis de conclure que le processus est surtout le fait des aérobies facultatifs. Parmi ceux-ci, un petit nombre pousse la dégradation de l'amidon jusqu'au stade acides organiques et gaz,

la grande majorité jusqu'au stade intermédiaire, type dextrine, colorable en bleu par l'iode. L'amyolyse se ferait dans le sol en deux temps, tous deux microbiens : hydrolyse partielle donnant des glucides solubles type dextrine, puis fermentation de ceux-ci par d'autres germes ; la fermentation totale directe serait beaucoup plus rare.

En ce qui concerne la protéolyse, des fragments d'organe stériles enfouis dans la terre sont protéolysés par une microflore zymogène constituée essentiellement d'aérobies facultatifs et nous avons pu montrer l'action de vagues successives de bactéries différentes.

Mais ces méthodes, si elles permettent d'analyser les phénomènes, sont sans valeur pour *mesurer* les pouvoirs amyolytique et protéolytique d'une terre donnée. Or, il nous a semblé qu'il s'agissait là, cependant, de données importantes pour caractériser les sols et devant rentrer dans l'analyse microbiologique courante des terres, au même titre que la mesure des pouvoirs fixateur, ammonifiant, nitrificateur, etc. Il fallait donc mettre au point des techniques simples, rapides, quantitatives ou donnant tout au moins un ordre de grandeur de ces activités.

TECHNIQUES. — Pouvoir amyolytique. — Alarie et Gray [3], à la suite de beaucoup d'autres, apprécient le pouvoir amyolytique en étalant des dilutions de terre sur gélose à l'amidon et en comptant les colonies qui s'entourent d'un halo brun (se détachant sur fond bleu) quand on verse du lugol sur la plaque. Cette méthode ne permet de compter que les germes qui hydrolysent jusqu'au stade dextrine.

Nous avons donc modifié et précisé la technique ainsi qu'il suit :

Milieu de culture. — Solution saline standard de Winogradsky diluée à 1/20 : 750 cm³ ; NO₃NH₄ : 1 g ; amidon : 20 g ; gélose : 15 g ; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,02 p. 100 : 15 cm³. L'amidon est, avant son incorporation au milieu, mis en suspension dans 250 cm³ d'eau et porté pendant une minute à ébullition. Le milieu est réparti à raison de 25 cm³ par tube et stérilisé. Chaque tube est, au moment de l'emploi, coulé en boîtes de Petri stériles.

Ensemencement. — A partir de 1 g de terre broyée au mortier, on prépare les dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁶. Les boîtes sont ensemencées (3 par dilution) avec 11 gouttes uniformément réparties à l'étaleur. Les boîtes sont incubées pendant quatre jours à 28°.

Après ce délai on compte, dans les dilutions les plus favorables, le nombre de colonies acidifiantes (halo jaune) toujours peu nombreuses. Puis on verse sur la surface 1 cm³ de solution de lugol et l'on compte à nouveau les colonies entourées d'un halo brun.

Pouvoir protéolytique. — Le substrat est du sérum normal de cheval stérile réparti à raison de 25 cm³ par boîte de Petri et coagulé par la chaleur (75°).

L'ensemencement est réalisé comme pour l'amyolyse. On compte, au quatrième jour, les colonies qui forment dans le milieu une petite cupule de liquéfaction.

Nous ne nous dissimulons pas ce que ces techniques ont de peu écologique et d'artificiel (en particulier l'emploi d'une protéine coagulée). Mais elles nous ont paru inévitables pour le but que nous nous proposons ici.

Résultats. — Toutes les expériences ont été faites sur 5 terres choisies aussi différentes que possible par leur origine, leur constitution et l'activité de leur microflore (déjà étudiée à d'autres points de vue).

Ar : Terre de pinède (Haute-Loire). pH = 4,5.

Ol : Oliveraie (Tunisie) pH = 8,5.

Se V. B. : Terre de culture pauvre (Côtes-du-Nord) pH = 5,4.

TP 2 : Terre de jardin (Institut Pasteur) pH = 7,2.

L 3 : Tourbière (Rambouillet) pH = 4.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant (les chiffres indiquent le nombre de germes par g de terre) :

	AMYLOLYTIQUES		PROTÉOLYTIQUES	
	Bactéries	Champignons	Bactéries	Champignons
Ar.	< 10 000	500 000	60 000	< 10 000
Ol.	3 000 000	400 000	50 000 000	< 10 000
SeVB.	500 000	300 000	400 000	< 10 000
TP 2.	13 000 000	3 000 000	100 000 000	< 10 000
L 3.	< 10 000	< 10 000	< 10 000	< 10 000

Il est bien évident que, comme pour toute numération de germes du sol, les chiffres ci-dessus n'indiquent qu'un ordre de grandeur. Cependant, ils permettent de différencier nettement les terres analysées.

Un certain nombre de faits sont à noter : l'absence de champignons protéolytiques. La microflore bactérienne protéolytique est plus abondante que l'amylolytique. Les terres acides sont nettement plus pauvres en bactéries que les terres neutres ou alcalines ; par contre, les champignons y sont nettement plus nombreux. Comme il fallait s'y attendre, la tourbe s'est révélée sans activité.

Ce dernier fait donne d'ailleurs la limite de sensibilité de ces méthodes ; en effet (H. de Barjac, non encore publié) les méthodes d'enrichissement *in situ*, elles, permettent de déceler dans cette tourbe des microflores amylolytique et protéolytique, mais les germes sont vraisemblablement trop peu nombreux pour être numérés directement. En ce qui concerne l'amyolyse, la proportion des colonies acidifiantes, par rapport à celles s'entourant d'un halo brun au lugol, est toujours faible, de l'ordre de 10 p. 100, et cela confirme nos études et conclusions antérieures.

Si l'on compare les résultats obtenus pour ces 5 terres, du point de vue protéolytique et amylolytique, avec ceux fournis, pour les mêmes terres, par l'ammonification, on note un parallélisme très net, en ce sens que les terres peuvent être classées dans le même ordre d'activité [4]. Le fait mérite d'être signalé, mais ne pourra être interprété qu'après étude beaucoup plus complète de l'ensemble des flores zymogènes.

Les méthodes que nous avons antérieurement proposées permettaient une analyse *qualitative* de l'amyolyse et de la protéolyse ; celles que nous apportons ici ont pour but une appréciation *quantitative* de

l'activité des microflores responsables de ces processus. Elles se complètent donc ; la simplicité et la rapidité des dernières permettraient leur emploi courant dans l'analyse microbiologique des sols.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] POCHON et CHALVIGNAC. *Ann. Agr.*, 1951, n° 4, 429.
- [2] POCHON et CHALVIGNAC. *Ces Annales*, 1952, 82, 690.
- [3] ALARIE et GRAY. *Can. J. Res. (C)*, 1947, 25, 228.
- [4] H. DE BARJAC et POCHON. *Ces Annales* (à paraître).

MODIFICATIONS APPORTÉES AU PROCÉDÉ DE GUERRA POUR L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION DES SUCRES PAR LES LEVURES ZYMATIQUES

par PHILIPPE-JACQUES LUTERAAN et CHARLES GUYOTJEANNIN.

Parmi les procédés mettant en évidence qualitativement le pouvoir fermentatif des levures à l'égard d'un sucre, le plus simple dans son principe est celui de Guerra : le milieu à faire fermenter est contenu dans un tube de 12 cm × 12 mm et surmonté d'un bouchon de paraffine qui s'interpose entre la surface du liquide et l'atmosphère ambiante ; la fermentation se révèle par le soulèvement du bouchon par le gaz carbonique produit. Le principe est bon : le rapport surface à volume, pour 5 cm³, est de l'ordre de 0,2 ; le bouchon de paraffine assure l'anaérobiose. Mais la réalisation est défectueuse, difficile et n'offre pas de garanties suffisantes ; ce que nous savons pour avoir employé et avoir vu employer ce procédé dans le laboratoire où il fut créé ; on comprend qu'il n'ait pas été cité dans la récente publication de Lodder et Kreger-Van Rij et il nous a appartenu de perfectionner ce procédé au point qu'il est devenu simple, précis, fidèle et complet dans ses réponses.

1° *Préparation de la verrerie et des milieux.* — Toute la verrerie, une fois propre et sèche, est nettoyée chimiquement au mélange sulfochromique, puis lavée plusieurs fois à l'eau du robinet en agitant et quatre fois à l'eau distillée, enfin séchée à l'étuve à 100°.

On peut se servir de tubes de 12 × 12 en verre pyrex ou d'un diamètre plus petit avec une longueur plus grande. Ces tubes, munis d'un bouchon en coton cardé, sont stérilisés à l'étuve à 100° pendant six-douze heures ; il n'y a pas à craindre, dans ces conditions, de formation ni de distillation ultérieure de produits pyrogénés à partir des bouchons.

On emploie une peptone dont on a établi qu'elle ne contenait pas de traces de sucre réducteur et qu'elle était infermentescible par la levure. 6 g (3 g suffisent déjà) sont dissous à chaud dans un bécher en s'aidant d'un agitateur, puis filtrés sur papier au-dessus d'une fiole jaugée de 125 cm³ ; rincer soigneusement bécher et papier quatre fois

avec une pissette d'eau distillée ; laisser refroidir, compléter au trait de jauge et homogénéiser par agitation plusieurs fois, en la renversant chaque fois, la fiole jaugée bouchée avec un bouchon parfaitement propre. On répartit le contenu de la fiole, à raison de 20 cm³ par prise, dans 6 fioles jaugées de 100 cm³ étiquetées respectivement, soigneusement et complètement avec le nom d'un sucre.

Les sucres sont pesés au trébuchet, chacun dans un bécher de 50 cm³, à raison de 2 (ou si l'on préfère 3) g par prise.

Sur la pastille dépolie du bécher est inscrit distinctement le nom du sucre et on ne s'occupera du sucre suivant qu'après avoir accompli, avec le premier, les opérations suivantes : dissoudre à froid avec de l'eau distillée, verser par entonnoir dans fiole jaugée portant l'étiquette correspondante, rincer, compléter au trait de jauge, ajouter 1 cm³ d'eau distillée, homogénéiser et répartir : 20 prises de 5 cm³, dans autant de tubes de 12 × 12 ; on a, dans ceux-ci, une solution à 1 p. 100 de peptone et à 2 p. 100 de sucre ; ces tubes sont placés au fur et à mesure dans un petit panier métallique contenant 2 étiquettes où est inscrit complètement le nom du sucre au crayon. On passe alors seulement au sucre suivant en utilisant évidemment une autre pipette pour la répartition et un nouveau panier.

Une fois les différents milieux répartis, on verse à leur surface, avec une pipette, V ou VI gouttes du mélange :

Paraffine	20 g
Huile de paraffine	20 cm ³

rendu homogène et maintenu en fusion au bain-marie chaud ; on vérifie sur les deux ou trois premiers tubes que le tampon de paraffine présente une hauteur de 2 mm-2,5 mm maximum ; pour les autres tubes, l'essentiel est que la paraffine soit dans les tubes sans avoir autrement à s'en préoccuper.

L'ensemble des opérations comprenant la préparation des 6 milieux et leur répartition, ainsi que celle de la paraffine, dure environ deux heures.

On procède à la stérilisation. L'eau de l'autoclave a été renouvelée après nettoyage de l'intérieur de la marmite. On met en place les paniers les uns à côté des autres et non les uns au-dessus des autres. On laisse le robinet de l'appareil ouvert ; on porte à 100° et à vapeur fluente ; on ferme le gaz et on abandonne une demi-heure pour retirer ensuite les paniers ; on laisse vingt-quatre heures à la température de la pièce et on recommence la stérilisation. En somme, l'autoclave a fait office de marmite de Koch. La seule précaution à prendre est de maintenir les tubes verticaux dans les paniers, pour que le tampon de paraffine se dispose convenablement en bouchon hermétique à la surface du milieu.

La conservation des tubes ainsi préparés et stérilisés est indéfinie à la température ambiante. Il est recommandé de les étiqueter individuellement et d'inscrire le nom du sucre.

2° *Préparation de la souche, ensemencement et observation ultérieure.* — La souche a été convenablement :

Purifiée par passages, au besoin, répétés sur milieux acides (liquide de Raulin glucosé ou sulfate d'ammonium-glucose) ;

Isolée en répétant le procédé des trois tubes.

Pour ensementer, on charge la spatule avec une culture de trois-quatre jours, on bascule avec la spatule le bouchon de paraffine et on porte la semence dans le fond du tube ; en retirant la spatule, on applique le bouchon de paraffine contre la paroi bien au-dessus de la surface du liquide ; on met le bouchon de coton ; avec la flamme de la veilleuse du Bunsen, on fait fondre la paraffine au travers de la paroi ; elle se place à la surface du liquide à nouveau en bouchon sans qu'il y ait de gaz emprisonnés et sans qu'il y ait eu le moindre chauffage du milieu sucré.

Mise à l'étuve des tubes ensementés à 28-30°.

3° *Différence avec la technique de Guerra.* — Il suffit de lire le mémoire de Langeron et Guerra pour se rendre compte combien leur technique de préparation du milieu jusqu'alors était compliquée et combien la stérilité, par crainte d'altération des sucres, était précaire ; l'observation a montré que, malgré la conservation à la glacière, l'infection des milieux était fréquente.

La principale critique s'adresse cependant au bouchon de paraffine constitué par un mélange difficilement fusible (car teneur trop haute en paraffine solide) alors que notre mélange est fusible à 47° et est le résultat d'une investigation systématique ; le mélange primitif était difficile à répartir, formait un bouchon de 4 mm et souvent plus, de hauteur ; ce bouchon était rigide ; il fallait le faire fondre juste au-dessus du milieu sucré pour pouvoir ensementer, d'où risque d'altération des sucres, et faire fondre ensuite ce bloc important pour le ramener à l'état de bouchon et chasser ensuite, à la flamme de la veilleuse, les gaz emprisonnés. De plus, ce bouchon rigide n'était pas adhérent à la surface liquide tandis que le nôtre, par suite de sa haute teneur en huile de paraffine, profite des propriétés physiques si intéressantes de celle-ci, à savoir : un étalement et une adhérence parfaite à la surface du milieu liquide ; le bouchon suit la surface du liquide ; l'adhérence aux parois du tube est également convenable ; si on renverse le tube enfin, rien ne se produit, ce qui montre la qualité du bouchon malgré sa faible inertie propre.

La simplicité des manœuvres lors de la préparation des milieux et de l'ensemencement, leur rapidité, font que, par les améliorations techniques apportées, le procédé de Guerra rentre dans la catégorie des procédés microbiologiques courants et simples, applicables à des organismes autres que les levures. On peut encore augmenter sa sensibilité en diminuant le rapport surface à volume en agissant sur la surface et en diminuant, si nécessaire encore, la hauteur du bouchon.

4° *Compléments à la technique de Guerra.* — On s'assure d'abord s'il y a fermentation du glucose pour savoir si la levure est, ou non, zymatique. S'il y a fermentation, on examine celles du galactose, du saccharose, du maltose. S'il y a fermentation d'un de ces trois sucres, on essaie le lactose et le raffinose.

En se conformant à nos indications, la fermentation du glucose et du maltose est toujours nette, ce qui n'était pas le cas autrefois et nous avons, maintes fois, relevé des erreurs à ce sujet.

Pour la fermentation du raffinose, l'artifice de Wickerham est à recommander. Nous procédons ainsi : dix jours au moins après la

fermentation du raffinose, nous ensemençons le milieu fermenté tel quel avec *Saccharomyces pastorianus*, levure vigoureuse qui fait fermenter le raffinose $2/3$; nous faisons adhérer à nouveau le bouchon à la surface du liquide ; si la fermentation était $1/3$, le bouchon est à nouveau soulevé ; s'il n'est pas soulevé, la fermentation était $2/3$ ou totale, ce dont on s'assure en employant *Saccharomyces carlsbergensis*, levure basse et malheureusement moins vigoureuse ; si le bouchon est alors soulevé, il y avait fermentation $2/3$. L'artifice de Skinner et Boutilhet sert de contre-épreuve : nous ensemençons le milieu au raffinose vierge avec un *Hansenula*, espèce vigoureuse qui fait fermenter le raffinose $1/3$, et dix jours après, avec la levure à étudier, en procédant comme déjà indiqué ; s'il n'y a rien, la fermentation est $1/3$; si le bouchon est soulevé par les gaz, il y a fermentation $2/3$ ou T.

Les essais poursuivis avec des souches identifiées et d'autres non identifiées, n'ont révélé aucune défaillance dans cette manière de procéder.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. LODDER et N. J. W. KREGER VAN RIJ. *The Yeasts. A taxonomic study.* 1952, North Holland publishing Cy, Amsterdam.
- [2] M. LANGERON et P. GUERRA. *Ann. parasit.*, 1938, **46**, nos 1, 2, 3, 4, 160 p., 22 pl.
- [3] L. J. WICKERHAM. *J. Bact.*, 1943, **46**, 501.
- [4] C. E. SKINNER et R. J. BOUTILHET. *J. Bact.*, 1947, **53**, 490.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Contribution à l'étude du pouvoir pathogène du bacille de Whitmore, par P. DE LAJUDIE et E. R. BRYGOO.

Détermination de la sensibilité microbienne aux sulfamides par une méthode de disques séchés, par Y. CHARBERT, F. BOYER et M. DECHEVASSINE.

Etude de l'intradermo-réaction aux suspensions de tréponèmes formolées (souche Nichols pathogène) chez les syphilitiques et les sujets normaux, par J. THIVOLET, A. SIMERAY, R. ROLLAND et F. CHALLUT.

Etude de la glycolyse chez certaines bactéries du genre *Bacillus* I. Déshydrogénases du glucose-6-phosphate et de l'acide 6-phospho-gluconique chez *B. subtilis* et *B. megatherium*, par R. DEDONDER.

Titrage du pouvoir ammonifiant des terres, par M^{lle} H. DE BARJAC et J. POCHON.

Culture *in vitro* du virus poliomyélitique en présence de tissu tonsillaire humain, par G. BARSKI, P. LÉPINE, V. MONACI et G. DE BRION.

LIVRES REÇUS

Selman A. Waksman. — *The Literature on Streptomycin 1944-1952*, Rutgers University Press, New Brunswick, N. J. (U. S. A.), 1952, 2^e édition, 553 pages. Prix : 5 dollars.

Six ans seulement se sont écoulés depuis que le professeur Waksman a eu l'heureuse idée de réunir la bibliographie des publications sur la streptomycine.

La deuxième édition de cet ouvrage nous permet de mesurer le chemin parcouru et la somme des travaux publiés sur un seul antibiotique, l'un des plus importants, il est vrai, pendant les années écoulées.

La deuxième édition nous offre en effet la liste des références bibliographiques de 5 550 publications avec la liste alphabétique des auteurs et une classification analytique permettant de retrouver, suivant le sujet, les publications qui s'y rapportent.

Œuvre de documentation monumentale, un tel livre ne s'analyse pas. C'est un outil de travail de premier ordre. Quiconque étudie la streptomycine et ses applications devra nécessairement s'y référer pour retrouver les auteurs et les publications se rapportant à ce sujet.

P. LÉPINE.

Visceral circulation. A Ciba Foundation Symposium. 1 vol., 278 p. J. et A. Churchill édit., Londres 1952. Prix : 30 sh.

Ce volume est le quatrième de la collection, les trois premiers ayant traité des « Toxémies de la grossesse », des « Maladies du foie » et des « Isotopes en biochimie ». Il comprend des communications présentées par des travailleurs venant de huit pays différents et les discussions qui les ont accompagnées, lors de la session tenue du 23 au 25 juillet 1951. Il est divisé en quatre parties : *Anatomie des vaisseaux des viscères* (circulation du tube digestif, des poumons, des reins, du foie, etc.) ; *Facteurs généraux régulateurs du courant sanguin* (lois physiques de l'écoulement dans les vaisseaux, formation de sympathine, de noradrénaline, leur destruction par l'amino-oxydase, les vaisseaux sanguins, organes percepteurs de la douleur) ; *Facteurs locaux régulateurs de la circulation* (réflexes, innervation, etc.) ; *Interaction entre circulation générale et viscérale* (rapport entre la circulation générale et la circulation intestinale ou rénale, modifications physiologiques au cours de l'évanouissement, etc.). Chaque article comporte sa bibliographie et le livre est complété par un index alphabétique.

H. T.

Hans Schmidt. — *Fortschritte der Serologie.* Fasc. 9, 10 et 11. Verlag Dietrich Steinkopff, Darmstadt, 1951. Prix : 6 DM par fascicule.

On trouvera d'abord exposées dans ces fascicules les théories modernes de la formation des anticorps (théorie de Pauling,

Jordan, etc.) : aucune n'est encore complètement satisfaisante et un certain nombre d'objections et d'inconnues demeurent. La cinquième partie, qui vient ensuite, traite des conséquences médiate et immédiate de la réaction antigène-anticorps et étudie l'hémolyse (hémolyse spécifique et non spécifique, hémolysines normales ou obtenues par immunisation, fixation de l'hémolysine sur les globules rouges, etc.). Vient ensuite l'étude du complément et de tous ses constituants : spécificité, action anticomplémentaire de certains sérums, inactivation du complément, son isolement, son titrage, réaction de fixation du complément (réaction directe, réaction indirecte et réaction de congulation) et son application à la réaction de Wassermann. La sixième partie est consacrée à quelques réactions sérologiques particulières. D'abord un chapitre sur l'hémagglutination, qui comprend l'étude des groupes sanguins : groupes sanguins classiques, leur hérédité, les agglutinogènes, les iso-anticorps, étude des groupes A et B et de leurs sous-groupes, du caractère O et des sérums anti-O ; l'iso-immunisation dans le système ABO ; étude des substances spécifiques des groupes sanguins chez l'homme et l'animal, leur purification ; le facteur Rh (hérédité et nomenclature, sous-groupes, nature de l'antigène Rh, mise en évidence de l'antigène et des anticorps Rh, rôle pathogène du facteur Rh chez l'homme et chez les animaux, préparation des immunsérums anti-Rh) ; facteurs M, N, S, P, E, G, X, H, Q, Lewis, Kell, Cellano, Lutheran, Duffy, etc. ; groupes sanguins des animaux.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.